

Utilización de inóculos comerciales conteniendo bacterias productoras de ácido láctico sobre las características fermentativas y estabilidad aeróbica de ensilaje de maíz¹

*Abner A. Rodríguez², Viviana Rivera³, Luis C. Solórzano⁴
y Paul F. Randel⁵*

J. Agric. Univ. P.R. 98(1-2):31-47 (2014)

RESUMEN

Se evaluaron dos tratamientos basados en la adición de dos inóculos microbianos comerciales, uno a base de bacterias productoras de ácido láctico (BPAL) homofermentativas (THO) y el otro una combinación de estas con heterofermentativas (THH), además de un tratamiento control sin inoculación (TCN), en sus efectos sobre las características fermentativas de maíz tropical en micro-silos y la estabilidad aeróbica (EA) del ensilaje resultante. Las características fermentativas se determinaron en muestras por triplicado, tomadas a diferentes largos de fermentación (15, 30, 58, y 90 d), que se analizaron para pH, concentración de ácidos orgánicos y NH_3 . Para evaluar la EA se monitoreó los cambios de pH y temperatura del ensilaje expuesto al aire durante cinco días. No se encontró diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las características fermentativas incluidas. Numéricamente el THO mostró en promedio el menor pH (4.23) y el mayor contenido porcentual de ácido láctico (AL) (2.18), seguido respectivamente por THH (4.28 y 2.11) y TCN (4.32 y 1.94). Los indicadores de EA tampoco difirieron significativamente entre tratamientos, pero hubo una diferencia en pH promedio del ensilaje expuesto, favorable a THO (5.30 vs 5.43 valor común en ambos THH y TCN); y una tendencia ($P < 0.15$) en temperatura promedio ($^{\circ}\text{C}$) favorable a THH (29.61 vs 30.26 en THO y 30.28 en TCN). En general, el uso de los inóculos de BPAL en ensilaje de maíz tropical no resultó en grandes diferencias relativo a ensilaje no inoculado en las variables dependientes en estudio relativo a características fermentativas y EA.

Palabras clave: bacterias productoras de ácido láctico, estabilidad aeróbica, ensilaje de maíz

¹Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 4 de octubre de 2013.

²*Catedrático, Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Autor para Correspondencia.

³Exestudiante Graduado, Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.

⁴Catedrático Adjunto, Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.

⁵Catedrático, Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.

ABSTRACT

Commercial microbial inoculants of lactic acid-producing bacteria on fermentative characteristics and aerobic stability of corn silage

This study evaluated two treatments based on addition of two commercial microbial inoculants of lactic acid-producing bacteria (LAPB), one of the homolactic type (HOT) and the other a combination of homolactic with heterolactic bacteria (HHT), plus a control treatment without inoculation (CNT), on the fermentative characteristics of tropical maize in micro-silos and aerobic stability (AS) of the resulting silage. The fermentative characteristics were determined in triplicate samples taken at various lengths of fermentation (15, 30, 58 and 90 d), which were analyzed for pH, concentration of organic acids and NH_3 . To evaluate AS, changes in pH and temperature of the silage were monitored during five days of exposure to air. No significant differences were found among treatments in any of the fermentation characteristics studied. HOT resulted in the numerically lowest average pH (4.23) and the highest average percentage content of lactic acid (2.18), followed by HHT (4.28 and 2.11) and CNT (4.32 and 1.94), respectively. Also, regarding indicators of AS there were no significant differences among treatments, but numerically the average pH of exposed HOT silage was lower (5.30 vs 5.43 the average value of both HHT and CNT) and there was a trend ($P < 0.15$) toward lower average temperature ($^{\circ}\text{C}$) in favor of HHT (29.61 vs. 30.26 and 30.28 for HOT and CNT silages). In general, the use of LAPB inoculants in tropical maize silage did not result in large differences relative to non-inoculated silage in the variables under study regarding fermentation characteristics and AS.

Key words: commercial microbial inoculants of lactic acid-producing bacteria, aerobic stability, corn silage

INTRODUCCIÓN

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

En las últimas décadas se ha adoptado en Puerto Rico el uso de ensilaje y henilaje como una alternativa alimentaria durante periodos de sequía y también para uso rutinario todo el año en algunas operaciones ganaderas. La producción de los mismos ha ido incrementado a través de los años llegando al punto de remplazar la utilización de heno en diferentes fincas alrededor de la isla. El método de henilaje se realiza mayormente en pacas cilíndricas de forraje de gramíneas tropicales de tallo fino. Idealmente dichos forrajes deberían presentarían abundancia de hojas en combinación con alta producción de biomasa, pero generalmente resultan ser de bajo valor nutricional (González y Rodríguez, 2003). Por lo tanto es necesario evaluar otras especies forrajeras (i.e., maíz, sorgo) para este propósito bajo condiciones locales. La calidad del ensilaje producido está influenciada por el manejo y el tipo de forraje. El ensilaje de gramíneas tropicales generalmente presenta pobres características fermentativas mayormente por el

bajo contenido de carbohidratos solubles en agua (CSA); alto contenido de paredes celulares y elevada capacidad amortiguadora (Aguilera et al., 1992). Además, se caracteriza por altas poblaciones de microorganismos epifíticos no deseables para participar en la fermentación del forraje (Rodríguez, 1996). El maíz es un cultivo muy usado como ensilaje y se presta para dicho propósito debido a su contenido óptimo de CSA; sin embargo, esta característica no siempre garantiza el logro de fermentaciones deseables. Asimismo, durante la fase de alimentación, el ensilado de maíz, como también otros ensilados que contienen granos, es susceptible al deterioro o daños por microorganismos aeróbicos (Muck, 2004; Kung y Rajit, 2001).

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetativo

El maíz (*Zea mays* 'Mayorbella') de 90 días de crecimiento se cosechó mecánicamente en terrenos de la Estación Experimental Agrícola (EEA) localizados en el municipio de Isabela, Puerto Rico (Longitud 67.05 N; Latitud 18.46 W). El forraje cosechado se transportó a la Finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez,

donde se redujo su tamaño a partículas de 0.5 a 7.5 cm de largo pasándolo por una máquina cortadora (Craftsman 305cc Drop Down Chipper/Shredder)⁶. Se colectaron muestras en triplicado del material vegetativo fresco picado (día 0) para determinar el pH y la composición química, iniciales. Para la determinación de la concentración de iones de hidrogeno (pH), se pesó 50 g de muestra y se mezcló con 450 ml de agua deionizada (pH neutro). La solución se homogenizó durante dos minutos utilizando un equipo homogenizador (Stomacher; 3500 Seward); posteriormente se filtró el líquido a través de una tela de tejido abierto. El efluente obtenido sirvió para la medición final utilizando un medidor de pH equipado con un electrodo de combinación (pH/Ion 510, Eutech Instruments/Oakton Instruments), que se estandarizó con soluciones amortiguadoras comerciales de pH 4, 7 y 10 (Fischer Scientific). El contenido porcentual de la materia seca (MS), materia inorgánica (MI), materia orgánica (MO; 100-MI), proteína bruta (PB), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y hemicelulosa (FDN-FDA) se determinó por métodos estándares (AOAC, 1990; Van Soest et al., 1991). Para la determinación del contenido de CSA, se envió una muestra a un laboratorio comercial (Dairy One Forage Lab, Ithaca, NY).

Proceso de fermentación

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

⁶Los nombres de compañías y de marcas registradas solo se utilizan para proveer información específica y su uso no constituye garantía por parte de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, ni endoso sobre otros productos o equipo que no se mencionan.

microsilos cerrados se mantuvieron a temperatura ambiente (28 a 30 °C) bajo condiciones del Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas durante todo el proceso fermentativo.

Para determinar los cambios en pH y concentración de productos de fermentación (ácidos orgánicos y de N-NH₃) durante el proceso fermentativo, se seleccionaron al azar tres microsilos por tratamiento para abrir a cuatro periodos de fermentación establecidos (15, 30, 58 y 90 d). El pH del material vegetativo fermentado se determinó como previamente descrito en el forraje fresco. Para la determinación de ácidos orgánicos y N-NH₃, muestras del efluente homogenizado se clarificaron por centrifugación durante 15 minutos y el líquido resultante se envió para análisis a un laboratorio comercial (Rock River Laboratory, WI). Además, se tomaron muestras de cada ensilaje correspondiente a cada tratamiento y día de fermentación para determinar su contenido de MS, MI, MO, PB, FDA, FDN, hemicelulosa (HC) y CSA utilizando la metodología previamente descrita.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el Modelo Lineal General de SAS (SAS Institute, 2004) según un diseño completamente aleatorizado (DCA) con un arreglo factorial 3 (Tratamientos) x 5 (Largo de Fermentación). La separación de las medias para establecer diferencias estadísticas se realizó mediante la prueba de Tukey con un nivel de $P < 0.05$.

Estabilidad Aeróbica

En los ensilajes resultantes correspondientes a cada tratamiento experimental a cada día de fermentación (15, 30, 58 y 90) se determinó la EA utilizando como criterios los cambios de pH y temperatura. Para cada combinación (tratamiento y día de fermentación), se tomaron muestras de 1,000 g del ensilaje de tres silos diferentes, se colocaron las mismas en bolsas plásticas dentro de un envase de porexpán y se dejaron expuestas a condiciones aeróbicas durante cinco días. Se monitoreó la temperatura de los ensilajes, utilizando un termómetro situado en la masa fermentada cada seis horas durante las primeras 24 h (0, 6, 12, 18, 24 h) y luego cada 24 h hasta completar los cinco días (48, 72, 96, 120 h). Además, en una muestra de ensilaje de cada combinación (tratamiento y periodo de fermentación) se determinó el pH después de 0, 1, 3, y 5 d de exposición aeróbica utilizando la misma metodología mencionada anteriormente.

El análisis estadístico de los datos de pH siguió un diseño de parcelas divididas con un arreglo factorial de 3 (tratamientos: TCN, THO y THH) x 4 (periodos de fermentación para obtener el ensilaje: 15, 30, 60 y 90 d) x 4 (días de exposición aeróbica: 0, 1, 3, y 5). Con los datos correspondientes a temperatura se utilizó también un modelo de parcelas divididas con arreglo factorial de los tres tratamientos, los cuatro

periodos de fermentación citados y las nueve lecturas de temperatura utilizando el silo como medida repetitiva durante los cinco días de exposición aeróbica. La identificación de las medias de ambas variables que difirieron significativamente ($p < 0.05$) se realizó mediante Cuadrados Medios Esperados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química

Los valores iniciales de pH y composición química del forraje utilizado en el presente experimento antes de ensilar (Cuadro 1) coinciden con observaciones previas sobre maíz cosechado en el trópico de Puerto Rico (Prieto-Prieto, 2007; Sandoval-Centeno, 2007; Arias-Carrasquillo, 1998). Al combinar los resultados obtenidos con los tres tratamientos el material vegetal tuvo un pH promedio inicial de 6.45 y contenidos porcentuales promedios de 41.14 MS y 94.56 y 5.44 de MO y MI a base seca, respectivamente. El contenido promedio de varias fracciones orgánicas fue 5.77% PB; 4.67% CSA; 57.16% FDN; 36.1% FDA; y 21.07% HC. La MS inicial citada (41%) se considera moderadamente alta, ya

CUADRO 1.—*Composición química inicial del maíz (Zea mays) inoculado con uno de los inóculos microbianos y el control sin inocular.*¹

Componente	Tratamiento			EEM ⁶	P
	TCN ²	THO ³	THH ⁴		
pH	6.58	6.26	6.50	0.05	0.28
Fracción Química (%)					
MS	41.99	41.41	40.03	7.55	0.69
MO ⁶	94.5	94.48	94.71	0.21	0.82
MI ⁶	5.5	5.52	5.29	0.23	0.82
PB ⁶	5.57	5.63	6.13	0.41	0.53
FDA ⁶	37.4	36.37	34.47	8.84	0.51
FDN ⁶	60.7	55.87	54.9	15.01	0.23
HC ^{6,7}	23.3 a ⁸	19.5 b	20.43 ab	1.85	0.03
CSA ^{6,9}	4.29	4.82	4.73	0.33	0.42

¹Media de tres repeticiones

²Control

³Ensilaje tratado con BPAL Homoláctica

⁴Ensilaje tratado con BPAL Homo- y Heteroláctica

⁵Error Estandar de la Media

⁶Base Seca

⁷Hemicelulosa = FDN-FDA

⁸Medias con diferentes letras en la misma fila difieren ($P < 0.05$)

⁹Carbohidratos Solubles en Agua

que excede la recomendación para este tipo de forraje de 32 a 38% (Huisden et al., 2009; Charley, 2006).

La aplicación de un inóculo microbiano antes de ensilar no debe haber tenido mucho efecto sobre la composición química inicial del forraje de maíz tropical, pero se observó una diferencia ($P < 0.05$) de 3.8 puntos de porcentaje en HC entre TCN y THO y variación entre 54.9 y 60.7% en FDN que no alcanzó significación ($P > 0.05$; Cuadro 1). No existe otra explicación para estas discrepancias que no sea variabilidad en el muestreo y la determinación de las fracciones FDN y FDA, que habrían afectado el estimado de HC también dado el modo de su cálculo (FDN-FDA). El valor EEM de 15.0% obtenido en el análisis de los datos de FDN evidencia esta situación.

Características Fermentativas

Los inóculos bacterianos se añaden al forraje con el propósito de estimular la producción de AL durante las etapas iniciales de fermentación y así mediante una acelerada reducción de pH asegurar la preservación del ensilaje. El efecto esperado de las cepas bacterianas tipo homofermentativas (i.e., *L. plantarum* y *E. faecium*) es mejorar el proceso de fermentación mediante una acelerada acidificación. Sin embargo, su efecto puede variar según las características inherentes del forraje (composición química y microflora epifítica) y las condiciones ambientales donde se realiza el proceso (Rodríguez, 1996). En este experimento no se observó grandes efectos de la aplicación de los dos inóculos evaluados sobre las características fermentativas del ensilaje de maíz obtenido en los tres tratamientos, ya que todos pueden catalogarse como indicativos de fermentación óptima (Cuadro 2; Charley, 2006).

Los tres ensilajes en conjunto presentaron en promedio un pH de 4.28 y contenidos porcentuales de AL de 2.08 (> 1.5), ácido acético (AA) de 0.34 (< 0.8), etanol (ETOH) de 0.24 (< 0.5) y la relación de $N-NH_3/N$ -Total de 5.05 (< 8), siendo los valores entre paréntesis los recomendados. Rooke y Hatfield (2003), plantean que ensilajes de maíz sin tratar con aditivos presentan típicamente una fermentación predominantemente homofermentativa, con pH bajo y óptima concentración de AL, además de baja concentración de AA. Sin embargo, la utilización de inóculos microbianos que aportan BPAL homofermentativas es una práctica ampliamente recomendada y utilizada en escala comercial (Hu et al., 2009). En este estudio, el tratamiento THO tendió ($P < 0.15$) a producir un ensilaje más ácido que el control (0.08 unidad de pH menor). Esta mayor acidez del ensilaje de THO correspondió a un levemente mayor ($P > 0.05$) contenido de AL que no alcanzó significación estadística, pero que resulta lógico (Cuadro 2). No se observaron

CUADRO 2.—Efecto de la aplicación o no de inóculos microbianos sobre los valores medios de pH y productos de fermentación de maíz ensilado bajo condiciones de laboratorio en un ambiente tropical.¹

Componente	Tratamiento			EEM ⁵	P
	TCN ²	THO ³	THH ⁴		
pH	4.32 z ⁶	4.24 x	4.28 xy	0.01	0.14
Producto de fermentación					
Ácido láctico (%)	1.94	2.19	2.11	0.15	0.22
Ácido acético (%)	0.35	0.34	0.34	0.01	0.73
ETOH (%) ⁷	0.27	0.21	0.24	0.01	0.54
N-NH ₃ /N-Total (%)	5.39	4.68	5.09	1.69	0.33
Ácido láctico: Ácido acético	5.54	6.44	6.20	0.68	0.17

¹Media de tres repeticiones

²Ensilaje Control

³Ensilaje tratado con BPAL Homolácticas

⁴Ensilaje tratado con BPAL homo- y heterolácticas

⁵Error estándar de la media

⁶Medias con tendencias P < 0.15

⁷Etolol

efectos importantes de los tratamientos en las concentraciones de AL y ETOH y tampoco efectos significativos (P > 0.05) sobre las variables proporcionales de N-NH₃/N-Total y AL:AA, pero la tendencia en estas favoreció el uso de los aditivos al indicar menor degradación de proteína y mayor predominación láctica.

La interacción entre tratamiento experimental y largo de fermentación en su efecto sobre las variables fermentativas evaluadas en este experimento (pH y productos de fermentación) careció de significación estadística en todo caso (Cuadro 3). Es decir, que los ensilajes de los distintos tratamientos no fueron afectados diferencialmente por el paso del tiempo hasta los 90 d de fermentación. Referente al efecto principal de largo de fermentación (LF), en general ya a los 15 d de fermentación se había establecido el patrón de resultados que perdurarían hasta los 90 d, sobretodo en el caso de pH, contenido de ETOH y proporción AL:AA. Las variables AL, AA y la relación N-NH₃/N-Total mostraron una módica tendencia ascendente con el tiempo. Los efectos de LF resultaron significativos (P < 0.01) excepto en el caso de la proporción AL/AA (Cuadro 3). En cambio, los tratamientos experimentales no ejercieron efectos significativos en ninguna de estas seis variables dependientes.

Teóricamente se esperaría que el material vegetativo inoculado con BPAL tipo homofermentativas (THO) o aquel inoculado con la combinación de bacterias tipo homo- y heterofermentativas (THH) resulta-

CUADRO 3.—Efectos combinados de tratamiento experimental y largo de fermentación sobre los valores medios de pH y productos de fermentación en ensilaje de maíz tropical tratado o no con inóculos microbianos.

Componente	LF	Tratamiento			EEM ⁴	Probabilidad		
		TCN ¹	THO ²	THH ³		TRT	LF	TRT*LF
pH	0	6.58	6.26	6.50	0.011	0.14	0.01	0.22
	15	3.82	3.77	3.78				
	30	3.74	3.74	3.72				
	58	3.72	3.68	3.67				
	90	3.75	3.77	3.76				
Productos de Fermentación (%)								
Ácido láctico	0	0	0	0	0.154	0.22	0.01	0.46
	15	2.29	2.51	2.58				
	30	2.23	2.52	2.13				
	58	2.25	2.71	2.08				
	90	2.92	3.20	3.66				
Ácido acético	0	0	0	0	0.005	0.73	0.01	0.39
	15	0.38	0.43	0.36				
	30	0.43	0.33	0.35				
	58	0.47	0.44	0.39				
	90	0.52	0.45	0.58				

¹Control

²Ensilaje tratado con BPAL Homolácticas

³Ensilaje tratado con BPAL Homo-y Heterolácticas

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

CUADRO 3.—(Continuará) *Efectos combinados de tratamiento experimental y largo de fermentación sobre los valores medios de pH y productos de fermentación en ensilaje de maíz tropical tratado o no con inóculos microbianos.*

Componente	LF	Tratamiento			EEM ⁴	Probabilidad		
		TCN ¹	THO ²	THH ³		TRT	LF	TRT*LF
ETOH	0	0	0	0	0.017	0.55	0.01	0.36
	15	0.36	0.23	0.38				
	30	0.27	0.22	0.25				
	58	0.34	0.44	0.22				
	90	0.38	0.18	0.34				
N-NH ₃ / N-Total	0	2.44	1.60	2.30	1.691	0.33	0.01	0.86
	15	5.46	4.65	4.45				
	30	5.24	4.29	5.29				
	58	7.00	6.00	6.84				
	90	6.82	6.84	6.55				
Ácido láctico:Ácido acético	0	0	0	0	0.68	0.17	0.77	0.70
	15	6.03	5.84	7.17				
	30	5.19	7.64	6.09				
	58	4.79	6.16	5.33				
	90	5.62	7.11	6.31				

¹Control

²Ensilaje tratado con BPAL Homolácticas

³Ensilaje tratado con BPAL Homo-y Heterolácticas

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

ran en ensilajes con mayor acidez, aportada principalmente por AL, que el ensilaje control (TCN). La ausencia de semejante efecto en este experimento coincide con las observaciones de otros investigadores de que la adición de inóculos microbianos antes de ensilar no siempre resulta en ensilajes con mejores características fermentativas (Schmidt y Kung, 2010; Filya et al., 2004).

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

Por su parte Filya et al. (2006) y Adesogan et al. (2004) han señalado que dos resultados indicativos del efecto positivo esperado de las cepas bacterianas añadidas antes de ensilar son un aumento en la relación AL:AA y una reducción en la concentración de NH_3 respecto al ensilaje sin el inóculo. Estos efectos tampoco fueron prominentes en el presente experimento.

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

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

Estabilidad Aeróbica

Forrajes ensilados en climas tropicales húmedos y cálidos podrían ser más susceptibles al crecimiento de microorganismos aeróbicos durante la fase de alimentación comparado con forrajes ensilados en climas templados (Pahlow et al., 2003). Rodríguez (1996) encontró que durante la exposición aeróbica las poblaciones de hongos y levaduras,

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

El efecto principal de tratamiento sobre el pH de los ensilajes expuestos al aire no resultó significativo. Sin embargo, el ensilaje de THH tratado con bacterias homo- y heterofermentativas mostró una temperatura media menor ($P < 0.05$) que el ensilaje control, sin diferir del ensilaje de THO inoculado con homofermentativas solamente (Cuadro 4).

CUADRO 4.—Efecto principal de la adición de inóculos microbianos sobre los valores medios de pH y temperatura de ensilaje de maíz expuesto a condiciones aeróbicas.¹

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

¹Media de tres repeticiones

²Ensilaje Control

³Ensilaje tratado con BPAL Homolácticas

⁴Ensilaje tratado con BPAL Homo- y Heterolácticas

⁵Error estándar de la media

⁶Medias con diferentes letras en la misma fila difieren ($P < 0.05$)

CUADRO 5.—*Efectos combinados del periodo de exposición aeróbica y los tratamientos experimentales sobre los valores medios de pH y temperatura de ensilaje de maíz.*¹

Componente	Día	Tratamientos			EEM ⁵	Probabilidad		
		TCN ²	THO ³	THH ⁴		TRT ⁶	D ⁷	TRT*D
pH	0	3.76	3.74	3.73	0.13	0.11	0.01	0.20
	1	4.02	3.8	3.75				
	3	6.78	6.5	6.89				
	5	7.19	7.16	7.35				
	Hora	TCN	THO	THH	EEM	TRT	H8	TRT*H
Temperatura (°C)	0	27.44	26.57	26.38	4.46	0.01	0.01	0.67
	6	29.48	28.38	28.27				
	12	30.00	28.78	28.56				
	18	30.23	28.70	28.28				
	24	31.16	30.73	28.83				
	48	33.53	33.39	33.40				
	72	35.05	35.08	34.86				
	96	30.51	30.83	30.28				
	120	30.38	30.65	28.80				

¹Media de tres repeticiones

²Control

³Ensilaje con BPAL Homolácticas

⁴Ensilaje con BPAL Homo- y Heterolácticas

⁵Error Estándar de la media

⁶Tratamiento

⁷Día

⁸Hora

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

Se ha sugerido que un incremento de 3° C sobre la temperatura ambiente representa la producción de calor suficiente para que un ensilaje se clasifique como inestable bajo condiciones aeróbicas. En este experimento, incrementos de tal magnitud se observaron después de aproximadamente 30 h en el ensilaje control, 32 h en el de THO y 36 h en el ensilaje THH (Figura 1).

CUADRO 6.—Efecto combinado promedio de días de fermentación y tratamientos experimentales a través del largo de exposición aeróbica sobre el pH y la temperatura en ensilaje de maíz.²

Componente	Días	Tratamientos			Probabilidad			
		TCN ¹	THO ²	THH ³	EEM ⁴	TRT ⁵	LF	TRT*LF
pH	15	5.52 z ⁶	5.43 y	5.48 y	0.13	0.11	0.01	0.13
	30	5.75 z	5.46 y	5.46 y				
	58	5.32	5.42	5.44				
	90	5.24	4.87	5.33				
Temperatura	15	30.03 a ⁷	29.34 ab	28.69 b	4.46	0.01	0.01	0.03
	30	33.04 a	31.83 ab	30.48 b				
	58	29.70 a	29.38 ab	28.53 b				
	90	30.53	30.48	30.74				

¹Control

²Ensilajes tratados con BAL Homolácticas

³Ensilaje tratado con BPAL Homo- y Heterolácticas

⁴Error estándar de la media

⁵TRT = Tratamiento, LF = Largo de Fermentación

⁶Medias con tendencias significativas ($P < 0.15$)

⁷Medias con diferentes letras en la misma fila difieren ($P < 0.05$)

Al examinar la relación entre el LF y el pH y la temperatura de los ensilajes expuestos al aire, se observan tendencias favorables al uso de los inóculos a los 15 y 30 d, pero posteriormente, y hasta los 90 d de fermentación, las tendencias son inconsistentes relativo al control (Cuadro 6).

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

CONCLUSIONES

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

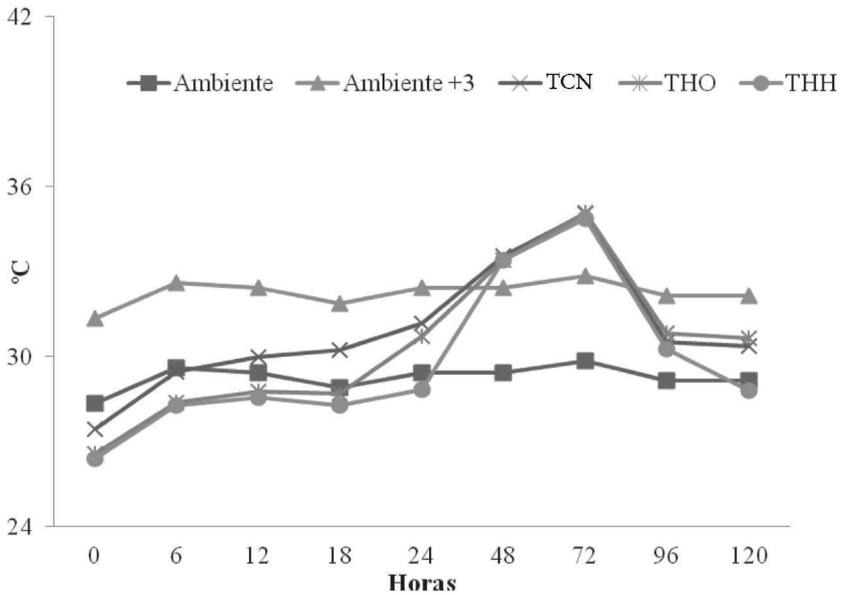


FIGURA 1. Temperatura observada durante el periodo de exposición aeróbica en ensilaje de maíz de los tres tratamientos experimentales.

LITERATURA CITADA

- Adesogan, A. T., N. Krueger, M. B. Salawu, D. B. Dean, and C. R. Staples, 2004. The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of Bermuda grass. *J. Dairy Sci.* 87:3407-3416.
- Aguilera, R., G. Llamas y A. Shimada, 1992. Valor nutritivo del ensilaje de pasto elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) CV Taiwan, adicionado con un inhibidor y dos estimulantes de la fermentación. *Tec. Pec.-Méx.* 30(3):196-207.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 15th Edition. Arlington, VA.
- Arias-Carrasquillo, F., 1998. Características fermentativas y estabilidad aeróbica de dos variedades de maíz tropical y hierba guinea ensilada a diferentes estados de madurez. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Tesis MS.
- Ashbell, G., Z. G. Weinberg, Y. Hen e I. Filya, 2002. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. *J. Ind. Microb. Biotech.* 28:261-263.
- Charley, R., 2006. Key Silage Management Topics. Lallemand Animal Nutrition North America. Milwaukee, WI p. 44-51
- Danner, H., M. Holzer, E. Mayrhuber y R. Braun, 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:562-597.

- Filya, I., E. Sucu y A. Karabulut, 2004. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. *J. Appl. Microbiol.* 97:818-826.
- Filya, I., E. Sucu y A. Karabulut, 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradation of maize silage. *J. Appl. Microbiol.* 101:1216-1223.
- González, G. y A. A. Rodríguez, 2003. Effect of storage method on fermentation characteristics, aerobic stability, and forage intake of tropical grasses ensiled in round bales. *J. Dairy Sci.* 86:926-933.
- Hu, W., R. J. Schmidt, E. E. McDonell, C. M. Klingerman y L. Kung, Jr. 2009. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *J. Dairy Sci.* 92: 3907-3914.
- Huisden, C. M., A. T. Adesogan, S. C. Kim y T. Ososanya, 2009. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 92:690-697.
- Kung, L., Jr. y N. K. Rajit, 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J. Dairy Sci.* 84:1149-1155.
- Martínez-Fleitas, J., 1998. Efecto de la aplicación de aditivos comerciales sobre las características fermentativas y estabilidad aeróbica de forrajes ensilados en ambientes tropicales. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Tesis M.S. pp15; 28-31.
- Muck, R. E., 2004. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. *Trans. ASAE* 47:1011-1016.
- Muck, R. E. y L. Kung, Jr., 1997. Effects of silage additives ensiling. In *Silage: Field to Feedbunk*. BRAES-99.NRAES, Ithaca, NY. pp: 187-199
- Pahlow, G., R. E. Muck, F. Driehuis., S. J. W. H. Oude Elferink y S. F. Spoelstra, 2003. Microbiology of ensiling. In D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison (eds.), *Silage Science and Technology*. American Society of Agronomy. Madison, WI: pp. 31-93
- Prieto-Prieto, R. J., 2007. Efecto del manejo de nitrógeno sobre características agronómicas, composición química y fermentativa de híbridos de maíz a diferentes edades de corte. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.
- Rajit, N. K. y L. Kung, Jr., 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservation on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 83:526-535.
- Rodríguez, A. A., 1996. Studies on the efficacy of a homofermentative lactic acid producing bacterial inoculant and commercial plant cell wall-degrading enzyme mixtures to enhance the fermentation characteristics and aerobic stability of forages ensiled in temperate and tropical environments. Ph.D. Dissertation. Michigan State University. East Lansing, MI. 351 pp.
- Rooke, J. A. y R. D. Hatfield, 2003. Biochemistry of Ensiling. In: D.R. Buxton, R.E. Muck and J.H. Harrison (eds) *Silage Science and Technology*. Agron. Monogr. 42. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. pp. 95-139.
- Rosario, C., 2012. Efecto de la aplicación de inóculos microbianos sobre las características fermentativas, estabilidad aeróbica y consumo voluntario de ensilaje de gramíneas tropicales naturalizadas. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.

- Sandoval-Centeno, B., 2007. Características agronómicas y nutricionales de asociaciones de gramíneas y leguminosas tropicales. Tesis Maestría. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.
- SAS Institute, 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide: SAS Institute, Inc. Cary (NC)
- Schmidt, R. J. y L. Kung, Jr., 2010. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silage made at different locations. *J. Dairy Sci.* 93:1616-1624.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson y B. A. Lewis, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:473-481.
- Wohlt, J. E., 1989. Use of a silage inoculant to improve feeding stability and intake of a corn silage-grain diet. *J. Dairy Sci.* 72:545-551.

