

Sucesión microbiana, productos de fermentación y estabilidad aeróbica de yerba guinea ensilada con un aditivo conteniendo inóculo de bacterias y enzimas fibrolíticas^{1,2}

Abner A. Rodríguez³, José L. Martínez⁴,
Raúl Macchiavelli⁵ y Ernesto O. Riquelme⁶

J. Agric. Univ. P.R. 85(3-4):151-164 (2001)

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la aplicación de un aditivo comercial que contiene bacterias productoras de ácido láctico y enzimas que degradan la pared celular, a razón de cero, uno o dos veces la dosis recomendada, sobre las sucesión microbiana, composición química, productos de fermentación y estabilidad aeróbica de yerba guinea (*Panicum maximum* var. Jacq). El forraje se cosechó a 30% de materia seca (MS) y se trozó en pedazos de 2.5 cm antes de ensilarse. El material vegetativo se asignó a uno de tres tratamientos: sin aditivo (control) y el aditivo aplicado a la dosis recomendada y a dosis dos veces mayor. Se abrieron tres silos por tratamiento después de 0, 2, 4, 7, 14, 28, y 56 d de fermentación y se determinó el pH, poblaciones microbianas y productos de fermentación del ensilaje. Para evaluar la estabilidad aeróbica, se abrieron tres silos por tratamiento y 400 g del ensilaje se expuso al medio ambiente durante 0, 1 y 3 d en envases de isopor cubiertos con plástico. Después de cada período de exposición aeróbica, el ensilaje se analizó para determinar pH, contenido de carbohidratos solubles en agua (CSA), poblaciones de bacterias totales, hongos y levaduras, productos de fermentación y degradabilidad in vitro de la materia seca (DIVMS). La temperatura se tomó dos veces al día durante los tres días de exposición aeróbica utilizando termómetros situados en la masa del ensilaje; la recuperación de la materia seca (RMS) se calculó después de 1 y 3 d de exposición aeróbica. El uso del aditivo, aplicado a una o dos veces la dosis recomendada, aumentó la población de bacterias productoras de ácido láctico y disminuyó la población de coliformes durante las etapas iniciales de la fermentación, pero no afectó la población de hongos y levaduras ni la composición química del ensilaje resultante. La yerba guinea tratada con el complejo bacterial-enzimático también resultó en ensilajes con un mayor contenido de ácido láctico después de 56 días de fermentación. La utilización del complejo bacterial-enzimático no afectó ($P > 0.05$) el pH, la temperatura, el contenido de CSA, los microorganismos enumerados, la DIVMS, ni

¹Manuscrito sometido a la junta editorial el 15 de diciembre de 2000.

²Proyecto Financiado por T-STAR/Grant: 97-34135-4714.

³Catedrático Asociado, Departamento de Industria Pecuaria, Apartado 9030, Mayagüez, PR 00681, Recinto Universitario de Mayagüez.

⁴Ex estudiante Graduado, Departamento de Industria Pecuaria.

⁵Catedrático Asociado, Departamento de Agronomía y Suelos.

⁶Catedrático, Departamento de Industria Pecuaria.

la RMS del ensilaje de yerba guinea expuesto al aire durante tres días. En resumen, la utilización del aditivo conteniendo bacterias y enzimas, aplicado a la dosis recomendada, mejoró parcialmente las características fermentativas en ensilaje de yerba guinea pero no favoreció la estabilidad aeróbica. No se observó ningún beneficio al aumentar la dosis del aditivo al doble de lo recomendado.

ABSTRACT

Microbial succession, fermentation end-products, aerobic stability of guinea grass ensiled with various doses of additive containing bacterial inoculant and fibrolytic enzymes

An experiment was conducted to evaluate the effect of three application rates (0, 1 and 2 times the recommended rate) of a commercial additive containing a lactic acid-producing bacterial inoculant as well as plant cell wall-degrading enzymes, on the microbial succession, fermentation end-products, and aerobic stability of guinea grass (*Panicum maximum* var. Jacq.) silage. Vegetative material was harvested at 30% dry matter (DM) and chopped into 2.5-cm pieces. At ensiling, three treatments were imposed: no additive (control), additive applied at recommended rate, and at 2× the recommended rate. Three silos per treatment were opened after 0, 2, 4, 7, 14, 28, and 56 d of fermentation, and silage was analyzed for pH, microbial succession, chemical composition, fermentation end-products and aerobic stability. For aerobic stability determination, three silos per treatment were opened at the end of the fermentation period, and silage (400 g) was exposed to air for three days in Styrofoam containers lined with plastic. After 0, 1, and 3 d of aerobic exposure, silage was analyzed for pH, microbial populations (total bacteria, yeast and molds), water soluble carbohydrate content, fermentation end-products and in vitro dry matter degradability (IVDMD). Temperature was monitored daily and dry matter recovery (DMR) was calculated after 1 and 3 d of aerobic exposure. The addition of the commercial additive, applied one or two times the recommended rate, increased ($P < 0.05$) the lactic acid producing bacterial population and decreased ($P < 0.05$) coliforms during early stages of the fermentation process, but did not influence the yeast and mold populations or the chemical composition of the resulting silage. Use of the inoculant-enzyme mixture also resulted in silage with higher lactic acid content 56 days post ensiling. The silage additive did not influence pH, temperature, microbial populations, soluble carbohydrate content, IVDMD or DMR of guinea grass silage after exposure to air. In summary, use of the commercial additive applied at the recommended rate partially improved the fermentation characteristics of guinea grass silage, but did not enhance its aerobic stability. Increasing the application rate to twice the recommended rate did not result in better fermentation.

Key words: Silage, guinea grass, bacterial inoculant, enzymes

INTRODUCCIÓN

La yerba guinea, introducida de Africa, es una planta perenne que crece en cepas, de crecimiento erecto, adaptable muy bien a suelos tropicales y resistente a sequías. Esta gramínea es apetecible al ganado y se utiliza como yerba de pastoreo, aunque también es recomendada para la producción de heno o yerba de corte (Vicente-Chandler, 1962). Sin embargo, su utilización como forraje conservado (ensilaje) durante la época

seca característica en ambientes tropicales se ve limitada debido a su bajo contenido de carbohidratos solubles en agua (CSA) y a su baja población de bacterias productoras de ácido láctico (Ojeda, 1987; McDonald et al., 1991). En climas templados y para mejorar la conservación de forrajes con características similares a la yerba guinea, la utilización en conjunto de aditivos comerciales en forma de inóculo conteniendo BPAL y enzimas que degradan la pared celular para incrementar la cantidad de sustrato disponible para la fermentación ha sido objeto de numerosos estudios (Henderson et al., 1982; Kung et al., 1997). En el trópico, la utilización conjunta de estos aditivos, aplicados a la dosis recomendada por el manufacturero, no mejoró las características fermentativas ni evitó el deterioro aeróbico en ensilajes de sorgo forrajero y yerba Johnson (Rodríguez, 1996). El objetivo de este experimento fue determinar el efecto de un aditivo comercial (inóculo + enzimas) aplicado a diferentes dosis sobre la sucesión microbiana, características fermentativas y estabilidad aeróbica de yerba guinea (*Panicum maximun* var. Jacq.) ensilada en el ambiente tropical de Puerto Rico.

MATERIALES Y MÉTODOS

La yerba guinea (*Panicum maximun* var. Jacq.) se cosechó y se trozó mecánicamente en pedazos de 2.5 cm en la Finca Montaña, Universidad de Puerto Rico, en Aguadilla. El forraje se analizó para determinar el contenido inicial de materia seca (65°C/72 h), cenizas (550°C/12 h), N-total (AOAC, 1990), CSA (Dubois, 1956), carbohidratos estructurales (Van Soest et al., 1991) y poblaciones microbianas epifíticas. Antes de ensilarse, el forraje se asignó a uno de tres tratamientos: sin aditivo (control, T1), aditivo aplicado a la dosis recomendada (T2), y aditivo aplicado 2× la dosis recomendada (T3). El aditivo comercial utilizado fue un complejo bacterial-enzimático (Silage Pro⁷, American Farm Products, Inc., Ypsilanti, MI), conteniendo enzimas purificadas (amilasa y celulasa) y BPAL tipo homofermentativo (*Pediococcus*, *Lactobacillus*). Para determinar la sucesión microbiana, 50 g de ensilaje correspondiente a cada tratamiento (n = 3) y día de fermentación (0, 2, 4, 7, 14, 28, 56) se mezclaron con 450 ml de agua destilada (pH 7.0) en bolsas plásticas esterilizadas; el contenido se homogenizó durante cinco minutos (Stomacher 3500). La solución homogenizada se filtró a través de cuatro capas de gasa esterilizada y el extracto diluido (10^{-2a}-10⁻¹⁰), en una solución estéril de peptona (0.01%). Tres grupos de microorganismos:

⁷Las marcas registradas sólo se usan para proveer información 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 equipos que no se mencionan.

Enterobacteriaceae (coliformes), BPAL y hongos y levaduras, se enumeraron manualmente utilizando las diluciones que fueron añadidas a placas Petri y medios de cultivo selectivos. El extracto de la solución homogeneizada de cada tratamiento, correspondiente a cada día de fermentación, se utilizó para determinar pH y analizar los productos de fermentación que incluyeron: contenido de N-amoniaco y ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico y butírico). La composición química del ensilaje resultante se analizó tal como se ha descrito para el análisis del material fresco para ensilarse.

Los datos de sucesión microbiana y características fermentativas se sometieron a un análisis de varianza para un diseño completamente aleatorizado, con un arreglo factorial de tratamientos, con tres dosis del aditivo comercial (inóculo + enzima) y siete períodos de fermentación (Steel y Torrie, 1980), utilizando el procedimiento de modelo lineal general en SAS (1990). La prueba de Bonferroni se utilizó para la separación de medias. Para evaluar la estabilidad aeróbica de los ensilajes resultantes, después de 56 días de fermentación se abrieron microsilos en triplicado de cada tratamiento. Muestras de cada silo (400 g) se dejaron expuestas al medio ambiente por tres días en bolsas plásticas situadas en envases de isopor. Después de 0, 1, y 3 d de exposición aeróbica, el ensilaje se analizó para determinar pH, cambios en composición química y productos de fermentación, como previamente descrito. La temperatura se tomó dos veces al día, durante los tres días de exposición aeróbica, utilizando termómetros situados en la masa del ensilaje. Además, se realizó un estudio de los microorganismos asociados con el deterioro aeróbico y que incluyeron hongos y levaduras (enumerados como previamente descrito) y bacterias totales (Tryptic Soy Agar con 2% agar) que fueron enumeradas después de 24 horas de incubación. La degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) del ensilaje resultante se determinó por el método de Tilley and Terry (primera etapa, 1963) y la recuperación de la materia seca (RMS) se calculó después de 1 y 3 d de exposición aeróbica, utilizando el peso inicial y final del ensilaje expuesto a condiciones aeróbicas, corregido por el contenido de materia seca.

Los datos del efecto del aditivo sobre la estabilidad aeróbica se analizaron del mismo modo que los datos de las características fermentativas, con excepción del arreglo factorial de tratamientos, que consistió de tres dosis del aditivo y tres días de exposición aeróbica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sucesión microbiana y características fermentativas

La yerba guinea utilizada en este experimento tuvo en promedio un pH inicial de 6.49, un contenido de materia seca de 30%, y un contenido

de materia orgánica y N-total de 91.18 y 1.44% (base seca), respectivamente. La concentración inicial de CSA fue de 0.97%, mientras que los contenidos de componentes de las paredes celulares fueron: FDN, 70.75%; FDA, 51.92%; y hemicelulosa, 18.83%. El grupo de microorganismos epifíticos que se encontró en mayor cantidad en la yerba guinea picada antes de ensilarse fue el de los coliformes (8.56 cfu/g de material fresco). La población de BPAL y los hongos y levaduras fueron detectados a niveles de 4.56 y 4.92 cfu/g de material fresco, respectivamente.

Se encontró una interacción ($P < 0.05$) entre dosis de aplicación y día de fermentación para el pH de los ensilajes, pero no se explica a través de tratamiento en cada día (Cuadro 1). En todos los ensilajes se observó un patrón variable y no definido en acidez durante el período de fermentación, lo que podría ser indicativo de cambios en las poblaciones microbianas a través del período de ensilamiento y variabilidad en los sustratos utilizados por los microorganismos asociados a la fermentación.

La población de BPAL fue mayor ($P < 0.05$) después de 2 y 7 d de fermentación en la yerba guinea ensilada con el aditivo conteniendo bacterias y enzimas, independientemente de la dosis de aplicación, que en el ensilaje control. La población de coliformes en ensilajes tratados con el aditivo aplicado a la dosis recomendada fue menor ($P < 0.05$) después de cuatro y mayor después de siete días de fermentación ($P < 0.05$) que en ensilajes sin aditivo, pero fue similar a la encontrada en los ensilajes conteniendo dos veces la dosis recomendada. La utilización del aditivo comercial no afectó la población de hongos y levaduras a través del período de fermentación. Los cambios observados en poblaciones microbianas en este experimento indican que el complejo bacterial-enzimático aplicado a la dosis recomendada disminuyó la población de coliformes y aumentó las BPAL durante las etapas iniciales de la fermentación. Sin embargo, después de dos semanas de fermentación no se encontró efecto del aditivo sobre ningún tipo de microorganismo enumerado.

A excepción de las diferencias observadas entre tratamientos en el contenido de CSA después de 28 días de fermentación, el complejo bacterial-enzimático utilizado en este experimento no afectó la composición química del ensilaje de yerba guinea (Cuadro 2). A través del período de ensilaje, en todos los tratamientos el N-total tendió ($P < 0.08$) a disminuir, el contenido de FDA aumentó ($P < 0.01$), la hemicelulosa disminuyó ($P < 0.01$) y el porcentaje de FDN se mantuvo constante. La variabilidad observada en el contenido de N-total y hemicelulosa durante el período fermentativo podría deberse a la pérdida de nitrógeno en forma de amoníaco y la solubilidad de la fracción hemicelulítica a condiciones ácidas, respectivamente. Estos cambios en composición química en los ensilajes de yerba guinea concuerdan con observaciones realizadas con sorgo

CUADRO 1.—Efecto del tratamiento y día de ensilado sobre el pH y la sucesión microbiana de yerba guinea ensilada en un ambiente tropical.

Características	Tratamientos ^a			Probabilidad (P > F)				
	Día	1	2	3	EEM ^b	T ^c	D ^d	T*D ^e
pH	0	6.49	6.48	6.51	0.04	0.216	0.001	0.023
	2	4.40	4.41	4.28				
	4	4.33	4.48	4.51				
	7	4.59	4.68	4.60				
	14	4.75	4.76	4.66				
	28	4.57	4.63	4.53				
	56	4.49	4.51	4.71				
Microorganismos								
Bacterias produc- toras de ácido láctico	0	3.72	5.17	4.81	0.45	0.001	0.001	0.001
	2	4.53 ^f	10.71 ^g	10.70 ^g				
	4	9.54	11.10	10.50				
	7	6.57 ^f	9.16 ^g	9.39 ^g				
	14	6.93	8.85	7.93				
	28	7.05	7.57	8.07				
	56	6.89	6.95	7.61				
Coliformes	0	9.33	9.11	7.26	0.57	0.317	0.001	0.001
	2	3.98	3.65	3.70				
	4	6.71 ^f	3.62 ^g	4.15 ^g				
	7	2.19 ^f	4.88 ^g	4.50 ^g				
	14	4.50	3.55	4.01				
	28	3.72	2.89	2.30				
	56	3.48	4.45	4.69				
Hongos y Levaduras	0	5.33	4.90	4.65	0.59	0.601	0.001	0.982
	2	2.08	2.65	2.02				
	4	3.29	2.99	2.88				
	7	3.94	4.02	3.84				
	14	4.32	4.28	4.19				
	28	4.06	3.50	2.90				
	56	2.15	3.11	2.86				

^a1: sin aditivo, 2: complejo inóculo + enzima aplicado a la dosis recomendada; 3: complejo inóculo + enzima aplicado al doble de la dosis recomendada.

^bError estándar de las medias.

^cEfecto de tratamiento.

^dEfecto de día de fermentación.

^eInteracción entre tratamiento y día de fermentación.

^fMedias entre tratamiento en la misma fila difieren (P < 0.05).

Se presentan las medias, basadas en n = 3 repeticiones.

CUADRO 2.— *Efecto del tratamiento y día de ensilado sobre la composición química de yerba guinea ensilada en un ambiente tropical.*

Características	Tratamientos ^a			Probabilidad (P > F)				
	Día	1	2	3	ESM ^b	T ^c	D ^d	T*D ^e
CSA	0	0.94	0.86	1.12	0.17	0.450	0.001	0.086
	2	1.25	1.07	1.03				
	4	1.24	0.83	1.04				
	7	0.77	0.58	0.84				
	14	0.58	0.62	0.61				
	28	0.53 ^f	1.15 ^f	0.36 ^g				
	56	0.86	0.42	0.44				
N-Total	0	1.30	1.50	1.53	0.05	0.243	0.085	0.201
	2	1.50	1.47	1.46				
	4	1.46	1.47	1.47				
	7	1.36	1.34	1.37				
	14	1.45	1.26	1.43				
	28	1.40	1.31	1.43				
	56	1.44	1.38	1.40				
FDN	0	71.74	71.31	69.22	0.96	0.190	0.120	0.560
	2	70.18	73.11	71.35				
	4	70.14	71.09	69.27				
	7	72.05	71.12	72.50				
	14	71.59	71.55	70.61				
	28	69.03	70.30	70.27				
	56	70.09	71.15	69.98				
FDA	0	51.80	51.95	52.00	0.74	0.386	0.001	0.329
	2	50.78	52.63	53.28				
	4	53.76	52.10	52.95				
	7	51.87	53.81	53.63				
	14	52.75	54.39	53.90				
	28	54.38	54.83	54.96				
	56	55.59	54.52	54.65				
Hemicelulosa	0	19.94	19.35	17.21	1.29	0.362	0.006	0.571
	2	19.39	20.48	18.06				
	4	16.37	18.98	16.32				

^a1: sin aditivo, 2: complejo inóculo + enzima aplicado a la dosis recomendada; 3: complejo inóculo + enzima aplicado al doble de la dosis recomendada.

^bError estándar de las medias.

^cEfecto de tratamiento.

^dEfecto de día de fermentación.

^eInteracción entre tratamiento y día de fermentación.

^fMedias entre tratamiento en la misma fila difieren (P < 0.10).

Se presentan las medias, basadas en n = 3 repeticiones.

CUADRO 2.—(Continuación) Efecto del tratamiento y día de ensilado sobre la composición química de yerba guinea ensilada en un ambiente tropical.

Características	Tratamientos ^a			Probabilidad (P > F)				
	Día	1	2	3	ESM ^b	T ^c	D ^d	T*D ^e
	7	20.17	17.30	19.87				
	14	18.84	17.16	16.71				
	28	14.65	15.47	15.31				
	56	14.83	16.63	15.33				

^a1: sin aditivo, 2: complejo inóculo + enzima aplicado a la dosis recomendada; 3: complejo inóculo + enzima aplicado al doble de la dosis recomendada.

^bError estándar de las medias.

^cEfecto de tratamiento.

^dEfecto de día de fermentación.

^eInteracción entre tratamiento y día de fermentación.

^fMedias entre tratamiento en la misma fila difieren (P < 0.10).

Se presentan las medias, basadas en n = 3 repeticiones.

forrajero y yerba Johnson ensiladas en climas tropicales (Panditharante et al., 1986; Rodríguez, 1996; Rodríguez et al., 1998).

El contenido de ácido láctico fue el único producto de fermentación influenciado por la utilización del aditivo a través del período de ensilaje (Cuadro 3). Se encontró una mayor (P < 0.05) concentración de lactato en los ensilajes conteniendo el complejo bacteriano-enzimático del día 14 al 56 de fermentación al compararse con ensilajes sin aditivo. Sin embargo, el aumentar la dosis del aditivo no resultó en ensilajes con mayor contenido de ácido láctico. El contenido de ácido acético fue menor (P < 0.05) en ensilajes conteniendo el aditivo comercial aplicado a la dosis recomendada que en ensilajes controles o en yerba guinea tratada con el aditivo aplicado al doble de la cantidad recomendada. El ácido butírico sólo se detectó el último día de fermentación en los tres tratamientos experimentales, pero a concentraciones que no afectan la calidad del ensilaje. No se detectaron concentraciones de ácido propiónico a través del período fermentativo. Se observó un incremento (P < 0.01) en el contenido de N-amoniaco durante las etapas finales de la fermentación, independientemente del tratamiento experimental. Sin embargo, el porcentaje del N-amoniaco, con relación al N-total, fue numéricamente mayor en los ensilajes tratados con el aditivo comercial, lo que es indicativo de una mayor degradación de compuestos nitrogenados a amoníaco.

La utilización del aditivo conteniendo el inóculo bacteriano y las enzimas que degradan la pared celular, aumentó la población de BPAL durante las etapas iniciales de la fermentación y el contenido final de

CUADRO 3.—*Efecto del tratamiento y día del ensilaje sobre los productos de fermentación de yerba guinea ensilada en un ambiente tropical.*

Productos de fermentación (g/100 g M.S.)	Tratamientos ^a			Probabilidad (P > F)				
	Día	1	2	3	ESM ^b	T ^c	D ^d	T ^g D ^e
Ácido acético	0	0.43	0.44	0.46	0.04	0.051	0.001	0.221
	2	0.41	0.42	0.51				
	4	0.36	0.26	0.31				
	7	0.26	0.12	0.16				
	14	0.18	0.15	0.21				
	28	0.14	0.17	0.24				
	56	0.13	0.22	0.28				
Ácido láctico	0	0.00	0.00	0.00	0.03	0.001	0.001	0.001
	2	0.02	0.04	0.04				
	4	0.09	0.18	0.16				
	7	0.18	0.16	0.24				
	14	0.25 ^f	0.42 ^g	0.44 ^g				
	28	0.25 ^f	0.66 ^g	0.70 ^g				
	56	0.23 ^f	0.82 ^g	0.78 ^g				
Ácido butírico	0	0.00	0.00	0.00	0.01	0.069	0.000	0.000
	2	0.00	0.00	0.00				
	4	0.00	0.00	0.00				
	7	0.00	0.00	0.00				
	14	0.00	0.00	0.00				
	28	0.00	0.00	0.00				
	56	0.02	0.03	0.03				
NH ₃ -N	0	0.06	0.03	0.05	0.01	0.796	0.001	0.383
	2	0.04	0.04	0.06				
	4	0.05	0.04	0.06				
	7	0.04	0.08	0.07				
	14	0.08	0.09	0.06				
	28	0.11	0.11	0.08				
	56	0.11	0.12	0.15				

^a1: sin aditivo, 2: complejo inóculo + enzima aplicado a la dosis recomendada; 3: complejo inóculo + enzima aplicado al doble de la dosis recomendada.

^bError estándar de las medias.

^cEfecto de tratamiento.

^dEfecto de día de fermentación.

^eInteracción entre tratamiento y día de fermentación.

^fMedias entre tratamiento en la misma fila difieren (P < 0.05).

Se presentan las medias, basadas en n = 3 repeticiones.

CUADRO 3.—(Continuación) Efecto del tratamiento y día del ensilaje sobre los productos de fermentación de yerba guinea ensilada en un ambiente tropical.

Productos de fermentación (g/100 g M.S.)	Tratamientos ^a			Probabilidad (P > F)				
	Día	1	2	3	ESM ^b	T ^c	D ^d	T*D ^e
% N-Total	0	4.66	2.27	3.59	1.20	0.757	0.001	0.318
	2	3.10	3.00	4.25				
	4	3.47	3.32	4.66				
	7	3.63	6.14	5.40				
	14	5.99	7.69	4.75				
	28	8.21	8.61	5.79				
	56	7.99	9.31	10.99				

^a1: sin aditivo, 2: complejo inóculo + enzima aplicado a la dosis recomendada; 3: complejo inóculo + enzima aplicado al doble de la dosis recomendada.

^bError estándar de las medias.

^cEfecto de tratamiento.

^dEfecto de día de fermentación.

^eInteracción entre tratamiento y día de fermentación.

^fMedias entre tratamiento en la misma fila difieren (P < 0.05).

Se presentan las medias, basadas en n = 3 repeticiones.

ácido láctico. Además, disminuyó la población de coliformes durante la primera semana de fermentación. Sin embargo, basándose en los cambios fermentativos observados en el ensilaje (contenido de ácido láctico, pH, N-amoniaco, como resultado de la utilización del aditivo, no se puede concluir que el ensilaje sea de calidad mejorada. Aumentar la dosis de aplicación del aditivo tampoco mejoró las características fermentativas del ensilaje resultante. La mayor concentración final de ácido láctico y menor contenido de CSA residuales, aunque con contenido de paredes celulares (FDN, FDA, hemicelulosa) similar al del testigo, podría ser indicativo de la actividad metabólica de las cepas de BPAL que componen el inóculo y de ningún efecto de la porción enzimática del aditivo comercial utilizado en este experimento. Contrariamente, el incrementar la dosis de aplicación del aditivo conteniendo el complejo inóculo + enzima resultó en un incremento numérico del contenido de N-amoniaco durante las etapas finales de la fermentación, lo que podría ser indicativo de la hidrólisis de las moléculas polipeptídicas debido a las condiciones de acidez dentro del silo o resultado de la utilización de las enzimas que componen el aditivo como sustrato por parte de los microorganismos asociados con el proceso de fermentación.

Estabilidad aeróbica

La utilización del aditivo conteniendo bacterias y enzimas no afectó el pH, la temperatura, el contenido de CSA, ni los microorganismos asociados con el deterioro aeróbico (Cuadro 4). El contenido de ácido acético y butírico también fue similar entre los tratamientos experimentales. La concentración de ácido láctico inicial y después del primer día de exposición aeróbica fue menor ($P < 0.05$) en ensilajes sin aditivos que en los ensilados tratados con la combinación del inóculo y las enzimas, pero fue similar después de tres días de exposición al aire. Sin embargo, la disminución de ácido láctico (0.09, 0.39 y 0.40% para los tres tratamientos, respectivamente) fue mayor en los ensilajes conteniendo el aditivo comercial, lo que podría ser indicativo de una mayor actividad metabólica de las poblaciones asociadas con el deterioro del ensilaje.

A través de la duración de la exposición a condiciones aeróbicas, la acidez de los ensilajes disminuyó ($P < 0.01$) y la temperatura aumentó ($P < 0.01$) después del tercer día, pero el contenido de CSA se mantuvo constante. Se encontró una disminución en la población de bacterias totales ($P < 0.01$) y una proliferación en las poblaciones de hongos y levaduras según aumentaba la duración de la exposición aeróbica, lo que asociado con la disminución en el contenido de ácido, podría indicar que las levaduras que utilizan lactato como sustrato fueron los microorganismos más activos en el deterioro del ensilaje de la yerba guinea. El contenido de ácido acético fue menor ($P < 0.01$) después del tercer día de exposición aeróbica que la concentración inicial o el contenido de acetato después del primer día en ensilaje expuesto al aire, lo que podría ser el resultado de una mayor actividad de bacterias que utilizan acetato como sustrato durante las etapas finales del período de exposición aeróbica.

No se encontraron diferencias significativas sobre la DIVMS de los ensilajes debido a los tratamientos experimentales o días de exposición aeróbica (Figura 1). La recuperación de la materia seca fue similar después del primer día de exposición aeróbica independientemente al tratamiento experimental. Sin embargo, fue menor ($P < 0.01$) en yerba guinea tratada con el aditivo aplicado a dos veces la dosis recomendada que en ensilajes sin aditivos o los ensilados tratados con el complejo bacterial-enzimático aplicado a la tasa recomendada (Figura 2). Los resultados de este experimento coinciden con aquéllos de estudios realizados con ensilajes de maíz y sorgo forrajero en ambientes templados (Stokes, 1992) y tropicales (Rodríguez, 1996), que demuestran que la adición de aditivos para ensilaje en forma de inóculos bacterianos y enzimas no evitó la inestabilidad aeróbica del ensilaje, y que el grado de deterioro de los ensilajes es mayor según aumenta el período de exposición aeróbica.

Cuadro 4.—Efecto del tratamiento y día de la exposición aeróbica sobre pH, temperatura, contenido de CSA, sucesión microbiana y productos de fermentación de yerba guinea ensilada en un ambiente tropical.

Características	Tratamientos ^a			Probabilidad (P > F)				
	Día	1	2	3	ESM ^b	T ^c	D ^d	T*D ^e
pH	0	4.49	4.51	4.71	0.11	0.564	0.012	0.146
	1	4.65	4.42	4.55				
	3	4.65	5.02	4.84				
Temperatura (°C)	0	27.43	28.66	29.33	0.69	0.246	0.056	0.541
	1	29.06	28.33	29.83				
	3	29.83	30.00	30.00				
CSA	0	0.86	0.42	0.44	0.17	0.681	0.243	0.365
	1	0.26	0.28	0.43				
	3	0.33	0.41	0.55				
Microorganismos								
Bacteria aeróbica	0	6.51	6.91	8.01	1.17	0.946	0.021	0.744
	1	5.83	4.91	4.08				
	3	4.45	4.05	4.46				
Hongos y Levaduras	0	1.82	2.78	2.53	0.86	0.577	0.001	0.420
	1	4.44	3.39	3.60				
	3	4.07	6.27	5.95				
Productos de fermentación (g/100 g M.S.)								
Ácido acético	0	0.13	0.16	0.15	0.01	0.712	0.004	0.239
	1	0.15	0.19	0.15				
	3	0.12	0.08	0.11				
Ácido láctico	0	0.23 ^f	0.82 ^g	0.78 ^g	0.03	0.001	0.001	0.001
	1	0.14 ^f	0.43 ^g	0.38 ^g				
	3	0.12	0.21	0.14				
Ácido butírico	0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.137	0.212	0.328
	1	0.02	0.01	0.01				
	3	0.01	0.01	0.01				

^a1: sin aditivo, 2: complejo inóculo + enzima aplicado a la dosis recomendada; 3: complejo inóculo + enzima aplicado al doble de la dosis recomendada.

^bError estándar de las medias.

^cEfecto de tratamiento.

^dEfecto de día de fermentación.

^eInteracción entre tratamiento y día de fermentación.

^fMedias entre tratamiento en la misma fila difieren (P < 0.05).

Se presentan las medias, basadas en n = 3 repeticiones.

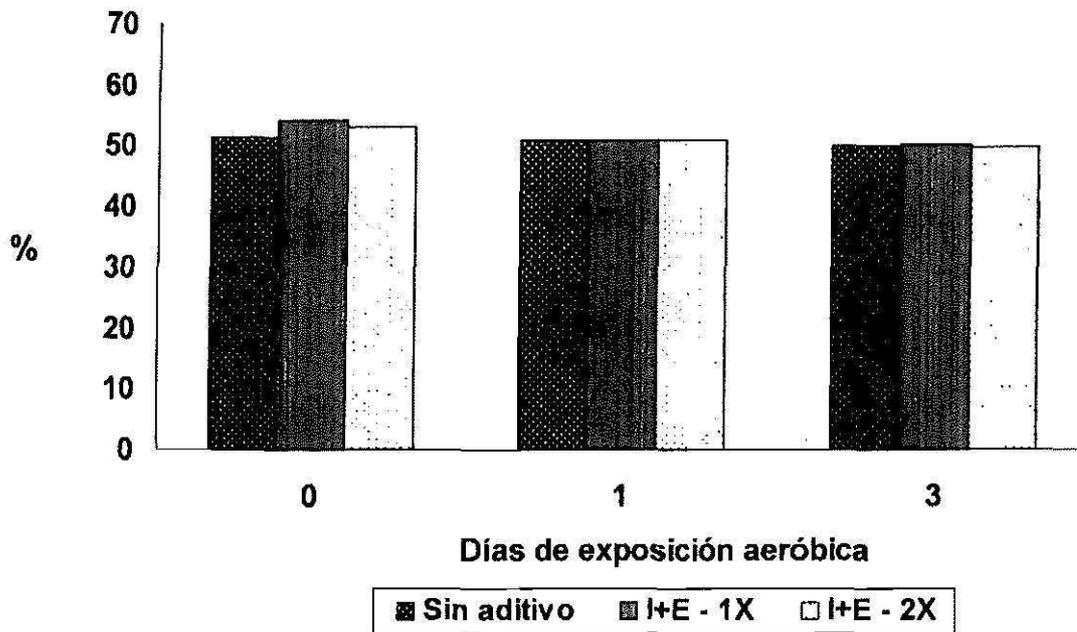


FIGURA 1. Efecto del aditivo y día de exposición aeróbica sobre la degradabilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) de yerba guinea ensilada en un ambiente tropical.

Se concluye que la utilización del aditivo comercial conteniendo bacterias y enzimas aplicado a la dosis recomendada fue efectiva al disminuir la población de coliformes, y aumentar la población de BPAL durante las etapas iniciales de fermentación y la concentración de ácido

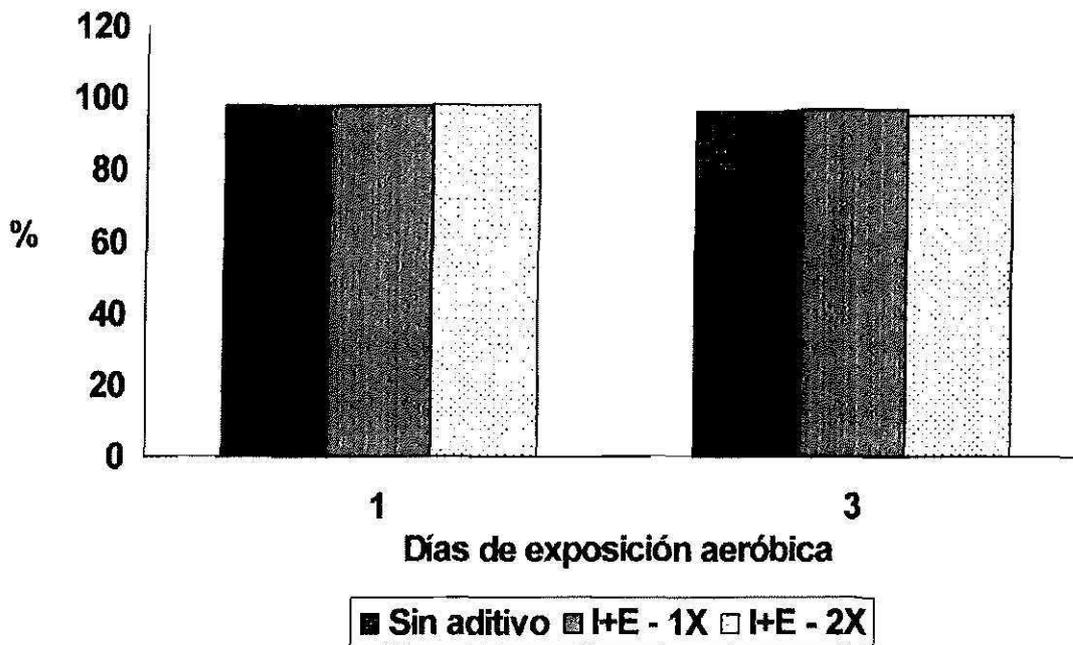


FIGURA 2. Efecto del aditivo y día de exposición aeróbica sobre el porcentaje de materia seca recuperada de yerba guinea ensilada en un ambiente tropical.

láctico luego de 56 días de ensilaje. Sin embargo, las características finales (e.g., pH, contenido de ácidos orgánicos) del ensilaje con aditivo no justifican definirlo como de mejor calidad. La utilización del aditivo aplicado a la dosis recomendada no evitó el deterioro aeróbico del ensilaje. El incrementar la dosis del aditivo comercial a dos veces la recomendada no afectó el proceso fermentativo ni la estabilidad aeróbica.

LITERATURA CITADA

- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28:350.
- Henderson, A. R., P. McDonald y D. Anderson, 1982. The effect of a cellulase preparation derived from *Trichoderma viride* on the chemical changes during ensilage of grass, lucerne, and clover. *J. Sci. Food Agric.* 33:16.
- Kung, L. y R. Muck, 1997. Animal response to silage additives. Proc. Silage: Field to Feedbunk. North American Conference. NRAES-99:200
- McDonald, P., A. R. Henderson y S. J. Heron, 1991. The Biochemistry of Silage. 2nd Ed. Cholcombe Publ. Cambriam Printers Ltd. Aberystwyth, UK.
- Ojeda, F., M. Esperance y L. Lissette, 1987. Ensilajes de pastos tropicales. *Pastos y Forrajes.* 10:189
- Panditharatne, S., V. G. Allen, J. P. Fontenot y M. C. N. Jayasuriya, 1986. Ensiling characteristics of tropical grasses influenced by stage of growth, additives and chopping length. *J. Anim. Sci.* 66:197.
- Rodríguez, A. A., 1996. Studies on the efficacy of a homofermentative lactic acid-producing bacterial inoculant and commercial, plant cell-wall degrading enzymes 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.
- Rodríguez, A. A., S. R. Rust, M. T. Yokoyama y E. O. Riquelme, 1998. Fermentation characteristics of Johnson grass ensiled at two regrowth periods with silage additives. *Trop. Agric. (Trinidad)* 75:457.
- SAS Institute, Inc., 1990. SAS/STAT User's guide (version 6). SAS Inst., Inc., Cary, NC. 549
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie, 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 2nd Ed., McGraw Hill, USA.
- Tilley, J. M. A. y R. A. Terry, 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Brit. Grass Sci.* 18:104.
- 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.* 74:3583.
- Vicente-Chandler, J., S. Silva y J. Figarella, 1962. Effect of frequency of application on response of guinea grass to nitrogen fertilization. *J. Agric. Univ. P.R.* 46(4):342.