



"Enseñar la Explotación de la
Tierra No la del Hombre"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIOS EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**ENSILAJE DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) Y OVILLO
(*Dactylis glomerata* L.) EN CONTENEDORES DE 200 LITROS
DURANTE LA ÉPOCA DE LLUVIAS**

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA



DIRECCIÓN CENTRAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Presenta:

RENATO GONZÁLEZ ORTIZ

Bajo la supervisión de: RICARDO DANIEL AMÉNDOLA MASSIOTTI, Ph.D.



Julio 2012

Chapingo, Estado de México

ENSILAJE DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) Y OVILLO (*Dactylis glomerata* L.) EN CONTENEDORES DE 200 LITROS DURANTE LA ÉPOCA DE LLUVIAS

Tesis realizada por **RENATO GONZÁLEZ ORTIZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



Ph.D. RICARDO DANIEL AMÉNDOLA MASSIOTTI

ASESOR:



Dr. LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO

ASESOR:



Dr. JUAN ANDRÉS BURGUEÑO FERREIRA

ASESOR:



M.C. PEDRO CRUZ MEZA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS	x
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2 REVISION DE LITERATURA	2
2.1 Ensilaje de alfalfa	2
2.2 Características fisicoquímicas y organolépticas de ensilados	3
2.3 Hora de cosecha	3
2.4 Marchitamiento de forraje previo al ensilaje	5
2.5 Uso de enzimas e inoculantes microbianos en el ensilaje de alfalfa	7
2.5.1 Enzimas fibrolíticas	8
2.5.2 Inoculantes bacterianos	9
2.6 Estabilidad aeróbica de ensilados	10
2.7 Literatura citada	12
3 ENSILAJE DE ALFALFA (<i>Medicago sativa</i> L.) Y OVILLO (<i>Dactylis glomerata</i> L.) EN CONTENEDORES DE 200 L DURANTE LA ÉPOCA DE LLUVIAS	16
3.1 Resumen	16
3.2 Abstract	17
3.3 Introducción	18
3.4 Materiales y métodos	19
3.4.1 Localización y duración del experimento	19
3.4.2 Forraje, contenedores y equipo de compactación	19
3.4.3 Inoculante	20

3.4.4	Procedimiento de ensilaje.....	20
3.4.5	Tratamientos.....	21
3.4.6	Variables medidas	21
3.4.7	Análisis estadístico	24
3.5	Resultados	25
3.5.1	Tiempo empleado en las actividades de ensilaje.....	25
3.5.2	Densidad del forraje.....	25
3.5.3	pH y capacidad buffer en forraje fresco	25
3.5.4	Contenido de materia seca de forraje al corte y post-marchitamiento .	25
3.5.5	Contenido de proteína cruda, fibra detergente neutro y carbohidratos solubles en alcohol en el forraje fresco.....	26
3.5.6	Temperatura, pH y nitrógeno amoniacal de los ensilados	27
3.5.7	Carbohidratos solubles en alcohol de los ensilados	28
3.5.8	Composición nutricional de los ensilados	28
3.5.9	Fermentación y desaparición ruminal <i>in vitro</i> de los ensilados	30
3.5.10	Estabilidad aeróbica de los ensilados.....	31
3.6	Discusión	34
3.7	Conclusiones.....	39
3.8	Literatura citada	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros fermentativos para evaluar la calidad de los ensilados.....	3
Cuadro 2. Indicadores organolépticos para la evaluación de ensilados (Ojeda, 2000).....	4
Cuadro 3. Medias de contenido de materia seca de forraje al momento del corte y post-marchitamiento	26
Cuadro 4. Promedio y error estándar de porcentajes de carbohidratos solubles en alcohol (CSA) y fibra detergente neutro (FDN) en forraje fresco de alfalfa y ovinillo.	27
Cuadro 5. Promedio e interacciones de los factores en pH y nitrógeno amoniacal (N-NH_3) de ensilados de forraje de alfalfa con ovinillo.	28
Cuadro 6. Promedio de contenido de FDN de ensilados de forraje de alfalfa con ovinillo por efecto de la interacción hora de corte x marchitamiento en las tres fases del experimento.....	30
Cuadro 7. Promedio de variables fermentativas y desaparición in vitro de ensilados de alfalfa con pasto ovinillo.....	32
Cuadro 8. Tasas promedio de temperatura y pH durante el deterioro aeróbico de ensilados de alfalfa con pasto ovinillo.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre el contenido de carbohidratos solubles en alcohol del forraje original y su correspondiente ensilado.	29
Figura 2. Efecto de la interacción de tiempo de marchitamiento x adición de inoculante sobre el volumen de gas producidos en la digestión <i>in vitro</i> de ensilados de alfalfa con ovillo en las tres fases del experimento.	31

DEDICATORIA

A mis padres Floriberto González Guerrero y Julia Ortiz Ibáñez, con la mayor gratitud y amor por los esfuerzos realizados para que yo llegara a tener una profesión, siendo para mí una de las mejores herencias.

A mi Abuela Ignacia González Guerrero por todas sus enseñanzas, consejos y amor que me ha brindado en toda mi vida.

A mis hermanos Elizabeth, Floriberto, Rolando, Verónica y Julieta por su cariño y apoyo mostrado en todo momento.

A todas aquellas personas que han creído en mí.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente al Posgrado en Producción Animal por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca otorgada para la culminación de la presente tesis de investigación

Al Dr. Ricardo D. Améndola Massiotti por su gran apoyo, paciencia y enseñanzas con las que dirigió mi formación académica.

Al Dr. Luis Alberto Miranda Romero por su amistad, apoyo, enseñanzas, confianza y facilidades en laboratorio que contribuyeron a mi formación académica.

Al Dr. Juan Andrés Burgueño Ferreira por su amistad, apoyo, disposición y facilidades brindadas en la realización del trabajo de investigación.

Al M.C. Pedro Cruz Meza por su asesoría en el diseño del sistema de compactación en contenedores.

A todos los profesores del Posgrado en Producción Animal por facilitarme los conocimientos.

A la empresa LALLEMAND NUTRICION ANIMAL MEXICO por proveernos el inoculante empleado en el experimento.

A mis compañeros de tesis y amigos David Salgado Torres y Martín Aguilar Rodríguez por haber permanecido siempre conmigo en las jornadas de trabajo de campo y laboratorio de la tesis.

A mi colaboradora de trabajo de laboratorio Fernanda Ramírez Flores (Juanita), su amistad y apoyo.

A mis amigos Carlos Delfino Herrera Monsalvo, Yunuen Rojas González, Itzel Santiago Figueroa y Oscar Rojas López con quienes compartí momentos inolvidables durante mi estancia en Chapingo.

A mis colegas de generación por sus amistad, compañía y convivencia.

A mis amigos de Maestría, Doctorado y Licenciatura del departamento de Zootecnia y de otros departamentos, por su amistad y convivencia.

Al Ing. Pedro Topete Pelayo y MVZ. Constanzo por su amistad y apoyo en trabajo de campo.

A los laboratoristas Laura, Braulio, Indalecio, José Luis, Fabián por su amistad, apoyo y facilidades en el trabajo de laboratorio.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Renato González Ortiz
Fecha de nacimiento	19 de septiembre de 1983
Lugar de nacimiento	Chignautla, Puebla
No. Cartilla militar	0367921
CURP	GOOR830919HPLNRN06
Profesión	Ingeniero Agrónomo Zootecnista
Cédula profesional	5695377

Desarrollo académico

Bachillerato	Bachillerato General Oficial Ignacio Manuel Altamirano, Chignautla Puebla.
Licenciatura	Ingeniero Agrónomo Zootecnista. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Maestría	Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera. Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La baja disponibilidad de forraje en la época seca es un grave problema en sistemas de producción de climas sub-húmedos. Por ello es de vital importancia que en la temporada de lluvias los excedentes de forraje sean conservados para proveer de alimento al ganado durante la época seca. En sistemas de producción de leche en clima templado las praderas asociadas de alfalfa con ovillo son ampliamente utilizadas gracias a la mejor distribución estacional de la producción de forraje y mayor valor nutritivo (Camacho y García, 2003). Durante la primavera existen condiciones ambientales adecuadas para conservar este forraje henificado en campo, sin embargo, en verano la práctica de la henificación es riesgosa debido a la frecuencia de lluvias, por lo que el ensilaje es mejor opción.

La conservación de forrajes mediante ensilaje tiene ventajas frente a la henificación debido a que presenta menores riesgos, menores pérdidas y mayor calidad del producto (Merry *et al.*, 2000). El ensilaje de forraje de alfalfa presenta algunos inconvenientes debidos a que su alto contenidos de ácidos, sales, proteínas, minerales y bajo contenido de carbohidratos solubles en agua (características que le confieren una alta capacidad buffer), lo convierten en un forraje difícil de ensilar en comparación con el de gramíneas (Zehra y Unal, 2011). Algunas prácticas permiten mejorar las características del ensilado de forrajes difíciles de ensilar, las más utilizadas son el corte en horas de la tarde, el marchitamiento previo y la adición de inoculantes bacterianos y enzimas fibrolíticas.

En lo referente al efecto de la hora de corte, Owens *et al.* (2002) encontraron que la cosecha de alfalfa después del medio día provee una oportunidad para incrementar la concentración de carbohidratos no estructurales y contenido de

MS en forraje de alfalfa; de esta manera se produce un rápido descenso del pH que minimiza la degradación de proteína durante estados tempranos de la fermentación (Guo *et al.*, 2006). La práctica de marchitar por unas horas el forraje de alfalfa previo al ensilaje, tiene el objetivo de incrementar el contenido de MS, aumentar el potencial osmótico de los fluidos celulares y reducir pérdidas de nutrientes vía efluentes. Muck (2010) recomienda que para la obtención de un buen ensilado de alfalfa es conveniente marchitar el forraje hasta alcanzar 30 a 40% de MS.

En años recientes se han empleado los inoculantes bacterianos para estimular la fermentación ácida en forrajes que son difíciles de ensilar como el de alfalfa (Knežević *et al.*, 2011), los cuales contienen bacterias ácido lácticas (BAL) homofermentativas (*Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., etc.) en algunos casos combinados con enzimas fibrolíticas que degradan los carbohidratos estructurales de las plantas (Kozelov *et al.*, 2008).

Con base en los antecedentes descritos, el objetivo central de esta investigación fue evaluar durante la época de lluvias la calidad del ensilado de forraje de alfalfa con ovillo, utilizando como silo contenedores de plástico con capacidad de 200L. Para el logro del objetivo central, se plantearon como objetivos específicos evaluar los efectos que, sobre la calidad del ensilado, tienen combinaciones de las siguientes alternativas tecnológicas del ensilaje:

- ✓ Hora del día en que se corta el forraje.
- ✓ Marchitamiento previo al ensilaje.
- ✓ Uso de inoculante.

2 REVISION DE LITERATURA

2.1 Ensilaje de alfalfa

El ensilaje de forraje verde es método tradicional usado para conservar alimento para el ganado; su importancia va en aumento y está remplazando a la henificación y a la alimentación directa con forraje verde (Danner *et al.*, 2002). Este método de conservación se basa en la fermentación natural; bajo condiciones anaeróbicas, las bacterias ácido lácticas (BAL) convierten carbohidratos solubles en ácidos orgánicos, principalmente láctico (Weinberg *et al.*, 2002). La conservación de forrajes por esta técnica permite proveer a los rumiantes de alimento suplementario en periodos en que la oferta de forraje fresco es limitada (Johnson *et al.*, 2005). La tecnología del ensilaje es simple e incluye el picado fino y la compresión del forraje, seguidos por el sellado hermético. Una vez que se ha sellado el forraje, impidiendo el contacto con el aire, las respiraciones del tejido vegetal y los microbios consumen el oxígeno que había quedado atrapado (McEniry *et al.*, 2010).

El ensilaje de alfalfa es una alternativa para evitar los daños por lluvias y pérdidas que ocurren durante la henificación (Guo *et al.* 2006). No obstante, el forraje de alfalfa es difícil de ensilar debido a que tiene una alta capacidad buffer y un bajo contenido de carbohidratos solubles en agua (Tyrolová y Výborná 2008). La comparación del forraje de leguminosas con el de trigo, revela que tiene menor contenido de materia seca (MS) (20.2 vs. 30.4%), alta concentración de proteína cruda (PC) (17.8 vs. 12.3%) y alta capacidad buffer (684 vs. 429 meq de ácido láctico kg^{-1} MS) (Pursiainen y Tuori, 2008). Sin embargo, el ensilaje de alfalfa es la mejor manera de preservar vitaminas durante la conservación, por lo menos en los casos en que la calidad del ensilado es buena con alta concentración de ácido láctico y bajas concentraciones de ácido acético, butírico, etanol y nitrógeno amoniacal (Lindqvist *et al.*, 2011)

2.2 Características fisicoquímicas y organolépticas de ensilados

De acuerdo a lo establecido por el laboratorio Neiker-Derio (2002) los parámetros a considerar para evaluar la calidad de un ensilado son pH, N-NH₃ y contenido de ácidos grasos volátiles, los valores de calidad se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Parámetros fermentativos para evaluar la calidad de los ensilados.

Calificación	Con un contenido de materia seca de:			N-NH ₃ (%)	Ácidos grasos volátiles (%)		
	<20%	20-30%	>30%				
	pH				Acético	Láctico	Butírico
Muy bueno	< 3.7	< 4.0	< 4.5	< 5			
Bueno	3.7 - 4.2	4.1 - 4.5	4.5 – 5.0	5 - 10	< 7	> 10	< 3
Aceptable	4.2 - 4.6	4.6 - 5.0	5.1 - 5.5	10 - 15	7 - 10	10 - 5	3 - 5
Malo	4.7 - 5.2	5.1 - 5.5	5.6 - 6.0	15 - 20	> 10	< 5	> 5
Muy malo	>5.2	>5.5	>6.0	>20			

La determinación de las características organolépticas permite evaluar subjetivamente la calidad de ensilados, es un método práctico y confiable para la evaluación de ensilados a nivel de campo. En la Estación de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, Ojeda (2000) desarrolló un sistema de indicadores organolépticos para la evaluación de ensilados con base en las características de color, olor textura y humedad; de esta forma es posible clasificar a los ensilados en calidad excelente, buena, regular o mala (Cuadro 2).

2.3 Hora de cosecha

Varias investigaciones han demostrado que el incremento del nivel de carbohidratos fermentables en el forraje que se va a ensilar, puede reducir la degradación de proteína por incremento en la tasa de descenso del pH; esta es la causa por la cual la hora de corte tiene un alto impacto en la reducción de pH del ensilado de alfalfa. Owens *et al.* (2002) registraron que el nivel de sustratos fermentables en forraje de alfalfa se incrementó a través del día, resultando en

una más rápida caída del pH en el forraje cosechado por la tarde, por lo que la hora de corte tuvo un marcado y consistente efecto de mejora en la producción de lactato en ensilado de alfalfa.

Cuadro 2. Indicadores organolépticos para la evaluación de ensilados (Ojeda, 2000).

Calidad	Características distintivas	
Excelente	Color	Verde aceituna
	Olor	Agradable a fruta madura y aceitunas, no deja olores desagradables al ser tocado
	Textura	Se conservan los bordes y vellosidades originales, las hojas aún están unidas a los tallos.
	Humedad	Al ejercerse presión sobre un puño de forraje no se humedece la mano y una vez que se deja de ejercer presión el forraje se suelta.
Buena	Color	Verde amarillento, los tallos más pálidos que las hojas.
	Olor	Agradable con un dejo a vinagre, no deja olor residual al ser tocado.
	Textura	Se conservan los bordes y vellosidades originales, las hojas aún están unidas a los tallos.
	Humedad	Al ejercerse presión sobre un puño de forraje no se humedece la mano y una vez que se deja de ejercer presión el forraje se suelta.
Regular	Color	Verde oscuro, hojas y tallos con la misma tonalidad.
	Olor	Ácido, con fuerte olor a vinagre; al ser tocado deja en las manos olor a mantequilla rancia (ácido butírico).
	Textura	Las hojas se separan fácilmente de los tallos, los bordes del forraje ya no está bien definidos, las hojas tienden a ser transparentes con sus nervaduras muy amarillentas.
	Humedad	Al ser comprimido el forraje en el puño escurren gotas, una vez que se le suelta permanece compactado con apariencia de formar una masa.
Mala	Color	Carmelita, casi negro.
	Olor	Desagradable, putrefacto o con tufo de humedad, deja en las manos un penetrante y duradero olor a mantequilla rancia
	Textura	No se aprecian diferencias entre hojas y tallos, todo es una masa sin forma, que puede llegar a ser jabonosa al tacto.
	Humedad	Escurre abundante humedad al tomarse un puñado de ensilado, se compacta con facilidad y se le puede moldear.

Se ha reportado que la hora de corte ha tenido un alto impacto en el contenido de MS del forraje y en el decline del pH en el ensilado de alfalfa; Owens *et al.* (2002) encontraron que el contenido de MS del forraje fresco de trébol y alfalfa cosechado por la tarde se incrementó, y consideraron que ese fue uno de los factores que permitió lograr menor pH y alta concentración de almidón en el ensilado de forraje cosechado por la tarde.

2.4 Marchitamiento de forraje previo al ensilaje

El contenido de MS de los forrajes antes de ensilar es un factor clave del éxito o fracaso en la conservación. El aspecto prioritario para obtener un ensilado de buena calidad es la cosecha de plantas con niveles óptimos de calidad nutritiva y MS; si el contenido de MS del forraje es bajo, para impedir el crecimiento de *clostridium*, el pH de estabilización del ensilado debe ser menor (Muck, 2010). En forrajes demasiado marchitos o secos (con contenidos de MS entre 45 a 50%), la capacidad de fermentación del ensilado se reduce parcialmente debido a falta de humedad necesaria para el crecimiento de *lactobacilos* (Kung, 2010). Lo anterior implica que existe un intervalo de contenido de MS en el cual la fermentación ocurre adecuadamente. Por ejemplo, Owens *et al.* (2002) detectaron un efecto negativo del bajo contenido de MS del forraje fresco sobre la evolución del pH del ensilado. Por su parte, Hashemzadeh-Cigari *et al.* (2011) encontraron que los contenidos de amonio y nitrato y la proteólisis en el ensilado se redujeron cuando disminuyó la actividad enzimática de la planta por efecto de un forraje con mayor contenido de MS; ello puede explicar la mejora en la calidad de la fermentación y el valor nutritivo en el ensilado de alfalfa marchita. Sin embargo, McEniry *et al.* (2010) observaron que la fermentación fue restringida en los forrajes con contenidos de MS superiores 40%; eso se evidenció en el alto pH del ensilado y su baja concentración de ácido láctico por lo que no es conveniente ensilar forrajes con tan altos niveles de MS.

La producción de efluente es una preocupación cuando se ensila forraje con bajo contenido de MS. Estos escurrimientos son ricos en azúcares solubles, nitrógeno y productos de la fermentación, por lo que no solamente representan

la merma de nutrientes digestibles en el ensilado, sino que además contaminan el medio ambiente. Un nivel mínimo de 30% de MS del forraje generalmente garantiza una buena fermentación y poco o ningún escurrimiento de líquidos (Muck, 2010).

Los contenidos altos de humedad del forraje a ensilar afectan negativamente la calidad fermentativa del ensilado; por ello se ha recomendado el marchitamiento en campo de los forrajes antes de ensilar dado que permite aumentar el porcentaje de MS (Tobía *et al.*, 2003). El marchitamiento ha sido ampliamente adoptado y fomentado como un medio para auxiliar la fermentación del ensilado (Conaghan *et al.*, 2010). En climas templados el marchitamiento puede resultar de mucha utilidad en épocas de verano, cuando se pretende ensilar leguminosas y otros forrajes con contenidos de MS menores a 20%. Por ejemplo, en el este de Canadá se marchita la alfalfa a niveles de MS superiores a 30% para reducir el riesgo de fermentación clostridial (Rizk *et al.*, 2005). No obstante, se deben tomar precauciones, ya que las concentraciones bajas de azúcares fermentables pueden ser un problema en los forrajes que han sufrido respiración excesiva, debido a tiempos prolongados de marchitamiento causados por clima nublado o lluvia directa (Kung, 2010). Por otra parte, no es conveniente un marchitamiento prolongado del forraje, ya que el excesivamente alto porcentaje de MS dificulta la compactación en el silo e incrementa el espacio poroso (McEniry *et al.*, 2007).

Varios autores reportan resultados positivos del marchitamiento previo sobre la calidad del ensilado. Nishino y Touno (2005) encontraron que el $\text{NH}_3\text{-N}$ disminuyó cuando los pastos fueron marchitos a alrededor de 30% de MS. Por su parte, en un experimento de ensilaje de cebada Lindqvist *et al.*, (2011) reportan que un corto tiempo de marchitamiento y buenas condiciones ambientales, sin precipitación durante el marchitamiento contribuyeron a que las pérdidas de α -tocoferol fueran bajas y no hubiera pérdidas de β -carotenos en el forraje. También Hashemzadeh-Cigari *et al.* (2011) reportan buenos resultados del marchitamiento de alfalfa, ya que incrementó los contenidos de MS y

carbohidratos solubles en agua del ensilado, con disminución de los contenidos de $\text{NH}_3\text{-N}$ y acetato del ensilado.

Sin embargo, no todos los resultados sobre marchitamiento han sido alentadores. Tobía *et al.* (2003) no observaron ningún efecto positivo en la reducción de pH en forraje de soya ensilado en microsilos, por efecto del aumento del contenido de MS en 10 unidades porcentuales al marchitar forraje en campo durante dos horas; es probable que la falta de respuesta se haya debido a que las condiciones de microsilos son generalmente uniformes y buenas por lo que no permiten detectar diferencias que se hubiesen presentado en silos de mayores dimensiones. Por su parte, Hristov y Mc Allister (2002) cuantificaron la concentración de ácido láctico en ensilados de forraje con y sin marchitamiento previo al ensilaje y encontraron que la concentración de ácido láctico fue menor en ensilado de forraje marchito ($29.2 \text{ g Kg}^{-1} \text{ MS}$) que en ensilado de forraje sin marchitar ($40.6 \text{ g Kg}^{-1} \text{ MS}$); este resultado probablemente se debió a que el contenido de MS del forraje sin marchitar fue adecuado (30%) en tanto que el del forraje marchito fue elevado (37%).

2.5 Uso de enzimas e inoculantes microbianos en el ensilaje de alfalfa

En los casos que la fermentación no fue debidamente controlada durante el proceso de ensilaje, el ensilado puede impactar negativamente en la salud y productividad animal. Por esa razón, se recomienda la adición de inoculantes de BAL como una de las maneras sencillas de controlar el proceso fermentativo y evitar el deterioro y riesgos para la salud animal (Rossi y Dellaglio, 2007). El tratamiento del forraje que se va a ensilar con enzimas fibrolíticas e inoculantes bacterianos aumenta la digestibilidad, fermentación y estabilidad aeróbica de los ensilados. Estos productos son más ventajosos que los inoculantes antiguos (como los ácidos), porque son fáciles de usar y seguros, no corroen los equipos agrícolas, y sobre todo porque no contaminan el ambiente (Ruiz *et al.*, 2009). En la actualidad estas tecnologías son ampliamente utilizadas en la conservación de ensilados en Estados Unidos y Europa (Muck *et al.*, 2007).

Para lograr un buen ensilado de alfalfa es necesario prevenir el crecimiento de clostridios y enterobacterias a través de una rápida caída de pH, misma que se logra a través de una efectiva fermentación (Jatkauskas y Vrotniakienė, 2009). Pero la microflora epifítica de BAL en los forrajes no siempre reduce rápidamente el pH porque la población inicial puede ser baja, particularmente en el caso de microorganismos homofermentativos. Entre las propiedades del forraje que pueden causar un descenso insuficiente del pH son el bajo contenido de carbohidratos solubles, el alto contenido de humedad o un avanzado estado de maduración (Rossi y Dellaglio, 2007).

2.5.1 Enzimas fibrolíticas

El efecto más consistente de las enzimas degradadoras de pared celular, como las celulasas y hemicelulasas, es que reducen la concentración de los carbohidratos estructurales y esta baja concentración de pared celular está asociada favorablemente con mayores consumos de MS en los animales (Nadeau *et al.*, 2000a). Dean *et al.* (2005) mostraron que la aplicación de enzimas fibrolíticas podía aumentar la digestibilidad, fermentación y estabilidad aeróbica del ensilado del pasto bermuda y adicionalmente reducir los constituyentes de la pared celular, lo cual como ya se indicó es un efecto típico del tratamiento con enzimas. En coincidencia con este resultado, Nadeau *et al.*, (2000b) observaron que la aplicación de celulasa a razón de 20 ml por kg de forraje fresco, disminuyó la concentración de Fibra Detergente Neutro (FDN) de ensilados de ovido y de alfalfa en 30 y 14% respectivamente.

Por su parte, Nadeau *et al.* (2000a) reportaron que la adición de celulasa previo al ensilaje de alfalfa marchita produjo mejores resultados en la fermentación, al estimular una mayor producción de ácido láctico y disminuir el pH gracias a una mayor degradación de la FDN. Los autores encontraron que al agregar inoculante bacteriano a la adición de celulasa disminuyó la concentración de ácido acético en 16% e incrementó la relación láctico: acético en 15%; adicionalmente, las concentraciones de $\text{NH}_3\text{-N}$ y FDN disminuyeron en 18 y 15% respectivamente. Estos cambios se reflejaron en mayor ingestión de esos

ensilados por ovinos en comparación con los ensilados testigo de los mismos forrajes.

2.5.2 Inoculantes bacterianos

La inoculación con BAL en los forrajes al momento de ensilar permite incrementar la microflora del forraje, con ello mejorar el proceso de fermentación (Mulrooney y Kung, 2007) y obtener un ensilado con alto valor nutritivo y mínimas pérdidas de MS (Hristov y Mc Allister, 2002; Rizk *et al.*, 2005). Los inoculantes bacterianos con productos que contienen cepas seleccionadas de BAL homofermentativas, como *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* y *Pediococcus spp* (Filya *et al.*, 2007).

Existen inoculantes compuestos por combinaciones de bacterias homofermentativas con *Lactobacillus buchneri*, la cual es una bacteria heterofermentativa que produce ácido acético a partir de ácido láctico; dicha combinación de microorganismos es más efectiva al mejorar la estabilidad aeróbica una vez que se abre el silo para la extracción del ensilado (Driehuis *et al.*, 2001). En términos generales, las características que debe tener un buen inoculante bacteriano para ensilados son: i) rápido crecimiento y exitosa competencia con la microflora epifítica, ii) homofermentación de azúcares, iii) rápida producción de ácido láctico y iv) rápida caída de pH a valores mínimos para minimizar la degradación proteica en estados tempranos de la fermentación (Jatkauskas y Vrotniakienė, 2009).

En diversas investigaciones se ha comprobado el efecto benéfico que tiene los inoculantes bacterianos en la calidad de la fermentación de los ensilados de alfalfa. Por ejemplo Tyrolová y Výborná (2008) encontraron que al añadir inoculantes bacterianos al ensilar alfalfa, el resultado fue un ensilado con mayor concentración de carbohidratos solubles en agua y contenido de ácido láctico y menor pH. En un experimento con alfalfa marchita hasta 34% de MS y adición de un inoculante bacteriano Jatkauskas y Vrotniakienė (2009) obtuvieron rápida caída pH en el tercer día, incremento en la concentración de ácido láctico y

disminución de FDN, fibra detergente ácido y ausencia de ácido butírico. Filya *et al.* (2007) determinaron que la adición de diferentes cepas de BAL al ensilado de alfalfa produjo alta variación en el incremento de la concentración de lactato con respecto al testigo sin inocular (entre 2.5 y 106%); la mayor concentración de lactato y las más altas relaciones lactato:acetato fueron producidas por la cepa *Pediococcus pentosaceus*.

El efecto de los inoculantes bacterianos en la calidad nutritiva de los ensilados también ha sido evaluado, encontrándose resultados positivos o neutrales. Por ejemplo Nadeau *et al.* (2000a) ensilaron forraje de ovillo y alfalfa marchitos con inoculante bacteriano y celulasa; encontraron que por efecto de los aditivos, la digestibilidad *in vivo* de los ensilados de ovillo y alfalfa aumentó 5 y 3%, respectivamente. Por su parte, Filya *et al.* (2007) evaluaron el efecto de 14 inoculantes (1.0×10^6 ufc/g de forraje) sobre la fermentación y valor nutritivo de ensilados de alfalfa, y encontraron que los inoculantes bajaron el pH y aumentaron ácido láctico, pero no mejoraron la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica. Por otro lado Lindqvist *et al.* (2011) utilizaron inoculantes bacterianos en el ensilaje de mezcla de trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) con timothy (*Phleum pratense* L.) y hallaron que los ensilados inoculados tuvieron un alto contenido de α -tocoferol, por lo que concluyeron que el uso de inoculantes es adecuado para preservar el contenido de vitaminas en el ensilado.

2.6 Estabilidad aeróbica de ensilados

Una vez que el silo ha sido abierto para remover el material, el ingreso de aire es inevitable, lo que promueve el crecimiento de microorganismos tolerantes a ácidos y la oxidación de los productos de la fermentación presentes en el ensilado (Danner *et al.*, 2002). La resistencia a esos cambios indeseables, que se conoce como estabilidad aeróbica, es uno de los atributos más apreciados de los ensilados. Los carbohidratos solubles en agua y el ácido láctico son sustratos para hongos y levaduras y además oxidan otros ácidos producto de la fermentación (Filya *et al.*, 2006), con la acción de estos microorganismos se

inicia el deterioro aeróbico causando reducción del valor nutricional de los ensilados e incrementando el riesgo de que comiencen a actuar microorganismos potencialmente patógenos (Driehuis *et al.*, 2001). El deterioro aeróbico del ensilado puede afectar la salud animal, y por tanto afectar la rentabilidad de la unidad de producción (Kristensen *et al.*, 2010).

Los indicadores de deterioro aeróbico de un ensilado son incremento de pH y temperatura, producción de CO₂ y aumento del número de levaduras y hongos (Filya *et al.*, 2006). Los ácidos orgánicos y los carbohidratos solubles en agua son degradados y el nitrógeno es volatilizado, de esta forma existe pérdidas de MS (Jatkauskas y Vrotniakienė, 2009). Además de las pérdidas de MS, el deterioro aeróbico de ensilados implica también el riesgo de contaminación del alimento con micotoxinas perjudiciales para la salud animal, producidas por hongos aeróbicos (Rossi y Dellaglio, 2007). El contenido de MS del ensilado influye también en su estabilidad aeróbica, McEniry *et al.* (2007) encontraron que los ensilados sin marchitar fueron menos estables que los ensilados marchitos, con corto tiempo de comienzo de calentamiento y un alto incremento de temperatura.

De acuerdo a Nishino y Touno (2005), la inoculación con bacterias ácido lácticas homofermentativas puede afectar la estabilidad aeróbica de un ensilado, porque el ácido láctico que se encuentra en alta proporción, puede ser oxidado fácilmente por levaduras y otros microorganismos en la presencia de aire. Sin embargo, Danner *et al.* (2002) observaron que la inoculación de ensilado de maíz con BAL heterofermentativas (*L. buchneri* y *L. brevis*) produjo altas concentraciones de ácido acético (55.3 g kg⁻¹ y 28.6 g kg⁻¹ con *L. buchneri* y *L. brevis* respectivamente), por lo que esos ensilados fueron mucho más estables contra el deterioro aeróbico. A partir de ese resultado, los autores concluyeron que la concentración de ácido acético determina la estabilidad aeróbica de los ensilados por que actúa como inhibidor de hongos y levaduras. En el mismo sentido Tyrolová y Výborná (2008) encontraron que al ensilar alfalfa tratada con un inoculante compuesto por *Lactobacilos buchneri* hubo

incremento en la concentración de ácido acético y la estabilidad aeróbica de ese ensilado fue mejor que la de un ensilado tratado con un aditivo químico (una mezcla de los ácidos fórmico, propiónico y benzoico. La acumulación de ácido acético en ensilados coincide con un lento pero seguro desarrollo de la población de *Lactobacillus buchneri* a partir de los 45 días de fermentación anaeróbica, lo que hace que el ensilado tenga una mejor estabilidad aeróbica al momento de su extracción (Schmidt *et al.*, 2009). Huisden *et al.* (2008) mencionan que en ensilados tratados con inoculante, la población de levaduras fue 25% menor y la estabilidad aeróbica fue superior con 71 h adicionales a las 25 h de estabilidad en ensilados sin inocular y ensilados con melaza.

2.7 Literatura citada

- Camacho G., J. L., J. G. García M. 2003. Producción y calidad del forraje de cuatro variedades de alfalfa asociadas con trébol blanco, ballico perenne, festuca alta y ovollo. Veterinaria México 34: 149-177.
- Conaghan, P., P. O'Kiely, and F. P. O'Mara. 2010. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. Journal of Dairy Science 93: 628-643.
- Danner, H., M. Holzer, E. Mayrhuber, and R. Braun. 2002. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology 69: 562-567.
- Dean, D. B., A.T. Adesogan, N. Krueger, and R. C. Littell. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass silage. Journal of Dairy Science 88: 994-1003.
- Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink, and P. G. Van Wikselaar. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. Grass and Forage Science 56: 330-343.
- Filya, I., E. Sucu, and A. Karabulut. 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. Journal of Applied Microbiology 101: 1216-1223.
- Filya, I., R. E. Muck, and F. E. Contreras-Govea. 2007. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. Journal of Dairy Science 90: 5108-5114.
- Guo, X., H. Zhou, Z. Yu, and Y. Zang. 2006. Changes in the distribution of nitrogen and plant enzymatic activity during ensilage of lucerne treated with different additives. Grass and Forage Science 62: 35-43.

- Hashemzadeh-Cigari, F., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, and A. Taghizadeh. 2011. The effect of wilting, molasses and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerne silage. *South African Journal of Animal Science* 41: 388-378.
- Hristov, A. N., and T. A. McAllister. 2002. Effect of inoculants on whole-crop barley silage fermentation and dry matter disappearance *in situ*. *Journal of Animal Science* 80: 510-516.
- Huisden, C. M., A. T. Adesogan, S. C. Kim, and T. Ososanya. 2008. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science* 92: 690-697.
- Jatkauskas, J. and V. Vrotniakienė. 2009. The influence of application of a biological additive on the fermentation and nutritive value of lucerne silage. *Zemdirbyste- Agriculture* 96: 197-208.
- Johnson, H. E., R. J. Merry, D. R. Davies, D. B. Kell, M. K. Theodorou, and G. W. Griffith. 2005. Vacuum packing: a model system for laboratory-scale silage fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 98: 106–113
- Knežević, J., M. Milenković, B. Milošević, D. Beković, M. Aksić, and B. Jašović. 2011. Suitability of alfalfa and orchard grass for ensilage. *Biotechnology in Animal Husbandry* 27: 1315-1320.
- Kozelov, K. L., F. Iliev, N. A. Hristov, S. Zaman, and A. T. McAllister. 2008. Effect of fibrolytic enzymes and an inoculant on *in vitro* degradability and gas production of low-dry matter alfalfa silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88: 2568-2575.
- Kristensen, N. B., K. H. Sloth, O. Højberg, N. H. Spliid, C. Jensen, and R. Thøgersen. 2010. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *Journal of Dairy Science* 93: 3764-3774.
- Kung, L. Jr., 2010. Cómo mejorar la efectividad de los aditivos o inoculantes para el ensilaje ¿porque no siempre funcionan? *In: Memorias del Simposio Lechero Internacional Forrajes: calidad preservación y uso óptimo. Expo leche San Marcos 2010(comp.)*, Aguascalientes 21,22 y 23 de abril de 2010. pp: 19-29.
- Lindqvist, H., E. Nadeau, and S. K. Jensen. 2011. Alpha-tocopherol and β -carotene in legume-grass mixtures as influenced by wilting, ensiling and type of silage additive. *Grass and Forage Science* 67: 119-128.
- McEniry J., P. O'kiely, N. J. W. Clipson, P. D. Forristal, and E. M. Doyle. 2007. The relative impacts of wilting, chopping, compaction and air infiltration on the conservation characteristics of ensiled grass. *Grass and Forage Science* 62: 470-484.
- McEniry, J., P. O'Kiely, N. J. W. Clipson, P. D. Forristal, and E. M. Doyle. 2010. Assessing the impact of various ensilage factors on the fermentation of

- grass silage using conventional culture and bacterial community analysis techniques. *Journal of Applied Microbiology* 108: 1584-1593.
- Merry, R. J., R. Jhones, M. K. Theodorou. 2000. The conservation of grass. *In*: Hopkins, A. (Ed), *Grass: Its production and Utilization*. Oxford University Press Oxford.
- Muck, R. E., I. Filya, and F. E. Contreras-Govea. 2007. Inoculant effects on alfalfa silage: *In vitro* gas and volatile fatty acid production. *Journal of Dairy Science* 90: 5115-5125.
- Muck, R.E. 2010. Influencia de los factores de manejo sobre la calidad de los ensilados *In*: Memorias del Simposio Lechero Internacional Forrajes: calidad preservación y uso óptimo. Expo Leche San Marcos 2010(comp.), Aguascalientes 21,22 y 23 de abril de 2010. pp: 1-11.
- Mulrooney, C. N., and L. Jr. Kung. 2007. Short communication: the effect of water temperature on the viability of silage inoculants. *Journal of Dairy Science* 91: 236-240.
- Nadeau, E. M., J. R. Russel, and D.R. Buxton. 2000a. Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulose, inoculant, and formic acid fed to lambs. *Journal of Animal Science* 78: 2980-2989.
- Nadeau, E. M. G., D. R. Buxton, J. R. Russell, M. J. Allison, and J. W. Young. 2000b. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of orchardgrass and alfalfa. *Journal of Dairy Science* 83: 1487-1502.
- Nishino, N., and E. Touno. 2005. Ensiling characteristics and aerobic stability of direct-cut and wilted grass silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1882-1888.
- Ojeda F. 2000. Técnicas de cosecha y ensilado. *In*: Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre el uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. L. t' Mannetje (ed.) Roma1 de septiembre a 15 diciembre 1999. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. pp: 133-140.
- Owens, V. N., K. A. Albrecht, and R. E. Muck. 2002. Protein degradation and fermentation characteristics of unwilted red clover and alfalfa silage harvested at various times during the day. *Grass and Forages Science* 57: 329-341.
- Pursiainen, P., and M. Tuori. 2008. Effect of ensiling field bean, field pea and common vetch in different proportions with whole-crop wheat using formic acid or an inoculant on fermentation characteristics. *Grass and Forage Science* 63: 60-78.
- Rizk, C., A. F. Mustafa, and L. E. Phillip. 2005. Effects of inoculation of high dry matter alfalfa silage on ensiling characteristics, ruminal nutrient

- degradability and dairy cow performance. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 743-750.
- Rossi, F., and F. Dellaglio. 2007. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1707-1715.
- Ruiz, B., O., Y. Castillo, A. Anchondo, C. Rodríguez, R. Beltrán, O. La O. y J. Payán. 2009. Efectos de enzimas e inoculantes sobre la composición del ensilaje de maíz. *Archivos de Zootecnia* 58: 163-172.
- Schmidt, R. J., W. Hu, J. A. Mills, and L. Kung Jr. 2009. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science* 92: 5005-5010.
- Tobia C., L. Uribe, E. Villalobos, H. Soto, I. Ferris. 2003. Aislamiento, selección y caracterización de BAL en ensilaje de soya. *Agronomía Costarricense* 27: 21-27.
- Tyrolová, Y., and A. Výborná. 2008. Effect of the stage of maturity on the leaf percentage of lucerne and the effect of the additives on silage characteristics. *Czech Journal of Animal Science* 8: 330-335.
- Weinberg, Z. G., G. Ashbell, Y. Hen, A. Azrieli, G. Szakacs, and I. Filya. 2002. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28: 7-11.
- Zehra, S. B., and Unal K. 2011. Effect of different additives on the nutrient composition, in vitro gas production and silage quality of alfalfa silage. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advance* 6: 618-626.

3 ENSILAJE DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) Y OVILLO (*Dactylis glomerata* L.) EN CONTENEDORES DE 200 L DURANTE LA ÉPOCA DE LLUVIAS

3.1 Resumen

El forraje de alfalfa es difícil de ensilar por su alta capacidad buffer. El objetivo fue evaluar efectos de combinaciones de horarios de corte (08:00 y 14:00 h), tiempos de marchitamiento (0, 1 y 2 h) y uso de inoculante bacteriano con enzimas fibrolíticas (Biotal plus II®) sobre la calidad de ensilados de forraje de alfalfa y ovillo usando contenedores de 200 litros. El experimento se realizó en Chapingo, México durante la época de lluvias en tres fases experimentales (repeticiones). En el forraje fresco se evaluaron el contenido de materia seca (MS) al corte y post-marchitamiento y la capacidad buffer; tanto en forraje fresco como ensilado se midieron pH, carbohidratos solubles en alcohol (CSA), proteína cruda (PC) y fibra detergente neutro (FDN); adicionalmente en ensilados se midieron MS, estabilidad aeróbica, nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y desaparición in vitro de la MS. En forraje fresco MS y CSA fueron mayores y de FDN menor en forraje cosechado a las 14:00 h; pH, capacidad buffer y PC no fueron afectados por la hora de corte y marchitamiento. En ensilados, los contenidos de N-NH₃ fueron menores en ensilados de forraje cosechado a las 14:00 h, en tanto que PC y temperatura (19°C) no fueron afectados por los factores. El contenido de FDN disminuyó 10% respecto al forraje fresco, las concentraciones de CSA fueron diferentes en la fase dos y la desaparición in vitro de la MS presentó diferencias en la fase tres. Tratamientos con inoculante presentaron menor estabilidad aeróbica en forraje cosechado a las 08:00 h. La cosecha a las 14:00 h fue ventajosa ya que el ensilado presentó mayores contenidos de MS y CSA y menor contenido de FDN. El uso de inoculante bacteriano con enzimas fibrolíticas no produjo ensilados de alfalfa de mayor calidad o estabilidad aeróbica.

Palabras clave: ensilado, *Medicago sativa*, *Dactylis glomerata*, marchitamiento, inoculante, hora de corte.

ENSILING ALFALFA (*Medicago sativa* L.) AND ORCHARD GRASS (*Dactylis glomerata* L.) IN 200 LITER CONTAINERS DURING THE RAINY SEASON

3.2 Abstract

Alfalfa forage is difficult to ensile due to its high buffer capacity. The objective was to assess the effects of combinations of time of harvesting (08:00 and 14:00 h), wilting time (0, 1, and 2 h) and the use of bacterial inoculums with fibrolytic enzymes (Biotal ® II plus) on the quality of silage made of alfalfa and orchard grass forage, using 200-liter containers as silos. The experiment was conducted at Chapingo, Mexico during the rainy season with three experimental phases (repetitions). Variables evaluated in fresh forage were dry matter content (DM) and buffer capacity; variables measured in fresh forage as well as in silage were pH, alcohol soluble carbohydrates (ASC), crude protein (CP) and neutral detergent fiber (NDF). Additionally, variables measured in silage were MS, aerobic stability, ammonia nitrogen (N-NH₃) and in vitro disappearance of DM. In forage harvested at 14:00 h, DM and ASC contents were higher and NDF content was lower; pH, buffering capacity, and PC content were not affected by harvest time. In silages, N-NH₃ and NDF levels were lower in silage made of forage harvested at 14:00 h, while temperature (19 ° C), CSA and PC contents and in vitro disappearance of MS were unaffected by harvest time. Treatments with inoculums were less aerobic stable when made of forage harvested at 08:00 and the opposite occurred in silage made of forage harvested at 14:00 h. Harvesting at 14:00 h was advantageous as silage presented higher DM and ASC contents and lower NDF content. The use of bacterial inoculums with fibrolytic enzymes did not improve the quality or aerobic stability of alfalfa silage.

Keywords: silage, *Medicago sativa*, *Dactylis glomerata*, wilting, inoculums, harvesting time.

Master of Science Thesis, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Renato González Ortiz
Advisor: Ph.D. Ricardo Daniel Améndola Massiotti

3.3 Introducción

En clima templado de México, las praderas de alfalfa con ovillo son usadas por su alta productividad, sin embargo su rendimiento en otoño e invierno es 50% menor al de primavera y verano (Améndola *et al.*, 2005). Ello hace necesaria la conservación de excedentes forrajeros. Sin embargo, debido a las lluvias de verano, la henificación es riesgosa por lo que el ensilaje es mejor opción.

El ensilaje de forraje de alfalfa es difícil por su alto contenidos de ácidos, sales, proteínas, minerales y bajo contenido de carbohidratos solubles, propiedades que le confieren una alta capacidad buffer (Zehra y Unal, 2011). Para mejorar las características del ensilado de este tipo de forrajes, se ha empleado el corte de forraje en la tarde, el marchitamiento previo y la adición de inoculantes bacterianos y enzimas fibrolíticas (Hashemzadh-Cigari *et al.*, 2011).

Con la cosecha de alfalfa en la tarde se incrementa la concentración de carbohidratos no estructurales y el contenido de materia seca (MS) (Owens *et al.*, 2002); así, en la fermentación se produce un rápido descenso del pH que minimiza la degradación de proteína (Guo *et al.*, 2006). El marchitamiento previo del forraje de alfalfa hasta alcanzar 30 a 40% de MS, tiene el objetivo de favorecer la competitividad de las bacterias ácido-lácticas (BAL) y reducir pérdidas de nutrientes vía efluentes (Muck, 2010); sin embargo, niveles de MS mayores a 40% no son recomendables ya que dificultan la compactación y el desarrollo las BAL se restringe. Los inoculantes bacterianos, con BAL homofermentativas como *Lactobacillus* spp. o *Streptococcus* spp.) se usan para estimular la fermentación ácida en forrajes que son difíciles de ensilar (Knežević *et al.*, 2011); en algunos casos se les combina con enzimas fibrolíticas que degradan los carbohidratos estructurales, haciéndolos disponible para las BAL y por tanto, aumentando la tasa de producción de ácido láctico (Kozelov *et al.*, 2008).

El ensilaje no es frecuente entre pequeños productores, debido a fallas en la validación y disseminación de tecnologías (Mannetje, 2000). Por ello, es

necesario generar tecnología de ensilaje adecuada a la escala de pequeños productores, con empleo mínimo de maquinaria para cosechar y compactar el forraje (Améndola *et al.*, 2009).

Con base en los antecedentes descritos, el objetivo de esta investigación fue evaluar durante la época de lluvias la calidad del ensilado de forraje de alfalfa con ovillo, utilizando como silos contenedores de plástico con capacidad de 200 L. Para el logro de ese objetivo se plantearon como objetivos específicos la evaluación de la calidad de los ensilados en función de los efectos de las siguientes alternativas tecnológicas del ensilaje: i) la hora de corte del forraje, ii) el marchitamiento previo y iii) el uso de inoculante.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Localización y duración del experimento

El trabajo de campo se realizó en tres fases de ensilaje entre junio y septiembre de 2011 en el Módulo de producción de leche en pastoreo de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, Estado de México, ubicado a 19°29' N, 98° 54' O y 2240 msnm.

3.4.2 Forraje, contenedores y equipo de compactación

Se usó forraje de una pradera de alfalfa asociada con ovillo de 0.37 ha, sembrada en noviembre de 2009; el forraje para ensilar se cosechó luego de 42 días de rebrote. Como silos se emplearon contenedores de plástico con capacidad de 200 L, 52 cm de diámetro y 95 cm de altura, con tapa y fleje para el sellado hermético.

Para la compactación del forraje se diseñó una estructura formada por dos postes verticales de concreto de 0.25 m de diámetro y 2.8 m de altura, separados 1.15 m y unidos en la parte superior por un travesaño de acero de 7.62 cm diámetro y 1.25 m de largo. En el travesaño se colocó un gancho con una polea, misma que para compactar forraje, se accionó con una cuerda para desplazar verticalmente un pistón de cemento con diámetro de 49 cm, 25 cm de altura y peso de 53 kg.

Para el desplazamiento controlado de pistón dentro de los contenedores, éstos se estabilizaron al colocarlos dentro de un aro metálico de 40 cm de altura que contó con bisagras para abrirlo al momento de introducir o sacar cada contenedor.

3.4.3 Inoculante

El inoculante comercial que se usó fue BIOTAL PLUS II® que contuvo las BAL homofermentativas *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus plantarum* deshidratadas con una densidad de 100,000 UFC/g de forraje fresco y las enzimas β -Glucanasa, α -Amilasa Xilanasas y Galactomanasa. Por cada t de forraje fresco se aplicaron con un atomizador 5 g de inoculante disueltos en 1L de agua.

3.4.4 Procedimiento de ensilaje

En las actividades de ensilaje participaron tres operadores; se cortó con guadaña, el forraje cortado (con o sin marchitamiento previo) se recogió con rastrillo y biello y se acarreó en una camioneta de 1t. A aproximadamente 300 m de la pradera, en un espacio acondicionado para ensilar, se localizaron los contenedores, el equipo de compactación y una picadora de forraje Mapusa® con motor eléctrico de 1.5 HP. El largo de partículas del forraje picado fue en promedio 3.5 cm; durante el picado con películas de polietileno se protegió el forraje de deshidratación y contaminación.

Para ensilar el forraje, se le colocó en los contenedores en capas de 5 kg extendidas con biello a las que se les aplicó inoculante con atomizador; dos operadores emplearon la cuerda y la polea para alzar y dejar caer el pistón 60 veces sobre cada capa de forraje; cuando el tramo que faltaba por llenar del contenedor era de menor altura que el pistón, se utilizó un tubo de lámina metálica de 50 cm de altura y 50 cm de diámetro como guía para la caída del pistón. Una vez lleno cada contenedor, se le colocó la tapa que se selló con tela adhesiva y se aseguró con el fleje. Los contenedores fueron pesados en una báscula Trutest® y colocados a la intemperie durante 60 días, luego de los cuales fueron abiertos para la toma de muestras.

3.4.5 Tratamientos

El experimento comprendió tres fases (fase1: junio-julio, fase 2: agosto, fase 3: septiembre) que se consideraron repeticiones, en las que se evaluaron 12 tratamientos con dos repeticiones en bloques dentro de cada fase. Los tratamientos resultaron de la combinación en arreglo de factorial completo 2x2x3 de dos horarios de corte (08:00 y 14:00 h), dos niveles de inoculante bacteriano (0 y 5 g/t forraje) y tres tiempos de marchitamiento (0, 1 y 2 h). Durante cada día de operación se llenaron dos contenedores (uno con forraje cortado a las 08:00 h y el otro con forraje cortado a las 14:00 h), siguiendo orden aleatorio.

3.4.6 Variables medidas

Con una estación meteorológica Davis Instruments Vantage Pro2® se registraron los datos de temperatura, precipitación y humedad al momento de la cosecha, marchitamiento y ensilaje del forraje, las cuales se utilizaron como covariables en el análisis estadístico del contenido de MS del forraje. Los contenedores fueron abiertos 60 días luego del ensilaje, se retiró una capa superior de ensilado de 30 cm, se midió la temperatura y se tomaron muestras para determinaciones de pH, contenido de MS, deterioro aeróbico y composición química.

Composición del forraje antes de ensilar

En el forraje recién cortado se tomaron muestras para medir composición botánica, y contenido de MS. Las muestras para medir contenido de MS (con o sin marchitamiento previo), temperatura, pH contenido de carbohidratos solubles en alcohol (CSA), y capacidad buffer se tomaron en el forraje picado, previo al ensilaje.

Para la estimación de la composición botánica se tomó una muestra compuesta, de 10 sub-muestras, se le separó manualmente en hoja de alfalfa, tallo de alfalfa, hoja de ovido, tallo de ovido, material muerto, gramíneas no sembradas y dicotiledóneas no sembradas, y posteriormente se secó a 65°C hasta peso constante. Se tomaron muestras de forraje fresco para determinación de MS al

momento de corte, según los tratamientos, luego del marchitamiento y al inicio, mitad y final de llenado de los contenedores; se registró el peso fresco de las muestras y también el peso luego de secarlas en estufa a 65 °C hasta peso constante. La temperatura se midió al inicio, a la mitad y al final del proceso de llenado del contenedor con un termómetro digital Thermo Scientific®. La medición de pH se realizó con un sensor portátil WPHH MTR & PROBE Thermo Scientific®, las muestras de aproximadamente 50 g de forraje fresco se tomaron en campo, se les congeló y posteriormente el pH fue medido en laboratorio. La determinación de CSA se realizó en 40 a 50 mg de muestra previamente molida aplicando el método de Dubois *et al.* (1956). La capacidad buffer del forraje fresco se determinó en muestras frescas 2.5 g de acuerdo al método descrito por Jasaitis *et al.* (1987).

Variables medidas en el ensilado

Las determinaciones realizadas en el ensilado comprendieron las siguientes variables: i) tal como en el forraje fresco temperatura, pH y contenido de CSA, ii) densidad, iii) deterioro aeróbico, iv) contenidos de proteína cruda (PC) y fibra detergente neutro (FDN), v) tasa de fermentación ruminal y desaparición *in vitro* de la MS, y vi) contenido de nitrógeno amoniacal.

Al momento de la apertura de cada silo se midió la temperatura del ensilado en cinco puntos de la capa superficial, y cinco puntos a 30 cm de profundidad. Para realizar la medición de pH, el día de la apertura de los silos se tomaron muestras de 100g, las cuales fueron refrigeradas para medición de pH en laboratorio cuatro horas más tarde. Asimismo, se tomaron muestras a las cuales se les determinó el contenido de CSA siguiendo el mismo procedimiento que se empleó en muestras de forraje fresco.

Para estimar la densidad del ensilado, luego del sellado hermético de cada silo se les pesó y el peso neto de forraje compactado se empleó para calcular la densidad (kg de forraje m⁻³) de cada unidad experimental.

El deterioro aeróbico del ensilado se evaluó en laboratorio empleando mediciones de temperatura y de producción de CO₂. Una vez abiertos los silos, se tomaron muestras de 1 kg de ensilado, cinco horas más tarde en laboratorio cada muestra fue dividida en tres sub-muestras de 300 g, que se introdujeron en frascos transparentes de vidrio con capacidad de 1L. Dos de esos frascos se usaron para la determinación de CO₂ producido por actividad respiratoria por el método de Winkler (2000); el tercer frasco permaneció destapado para medir la temperatura a las 08:00, 14:00 y 20:00 h durante cinco días.

El contenido de proteína cruda del ensilado se estimó mediante el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 2000), en tanto que para estimar su contenido de FDN se empleó el método de Van Soest descrito por Sosa (1979).

La tasa de fermentación ruminal de muestras de ensilado se estimó mediante la técnica de la producción de gas descrita por Menke y Steingass (1988). En frascos color ámbar de 120 mL se colocaron 0.5 g de muestra seca (molida con criba de 2 mm) con 90 mL de inóculo ruminal estandarizado, dentro de los frascos existió un flujo constante de CO₂. Una vez que se retiró el CO₂, se selló el frasco con un tapón de goma. Con una aguja hipodérmica se extrajo el aire del interior del frasco para igualar a cero la presión interior, posteriormente los frascos fueron incubados en baño maría por 96 h a 39 °C (se usaron tres repeticiones, tres frascos blancos sin muestra, con solución mineral estandarizada y líquido ruminal). La presión de gas generada por la fermentación del sustrato se midió con un manómetro con escala de 0-1 kg cm⁻², provisto de una llave trifásica y aguja hipodérmica, las mediciones se realizaron con intervalos de una hora en las primeras 24 h y posteriormente cada 4 h, después de cada lectura se igualó la presión a cero. Se utilizó el paquete estadístico SAS 9.2® para estimar las variables de producción de gas: volumen, tasa de producción de gas y tiempo de retardo.

Una vez terminado el periodo de incubación de los frascos de fermentación ruminal se filtró el residuo con papel filtro y se secó en estufa a 60 °C durante 24 h. El peso neto del residuo se consideró como MS final, la desaparición *in vitro* de

MS (DivMS) se calculó como la diferencia entre MS inicial y MS final expresada como porcentaje de la MS inicial.

Para estimar el contenido de nitrógeno amoniacal de muestras de ensilados se pesaron 10 g de ensilaje picado y dentro de frascos ámbar con capacidad de 200 mL se les mezcló con 90 ml de agua destilada. Los frascos fueron agitados en baño maría durante 10 min, se dejó sedimentar las muestras y se tomaron 25 ml del extracto, se les centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos en tubos de centrífuga de 50 ml. Posteriormente con pipeta se succionaron 1.6 ml del sobrenadante y en un tubo ependorf se les agregó 0.4 mL de ácido metafosfórico, se tapó el tubo y se agitó manualmente. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración durante más de 12 h hasta su análisis en espectrofotómetro de luz ultravioleta a 630 nm por la técnica de McCullough (1967).

3.4.7 Análisis estadístico

De acuerdo al arreglo de tratamientos en factorial completo (2x2x3) y diseño en bloques incompletos al azar con tres repeticiones completas el modelo estadístico que se utilizó fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Rep.} + \text{Bloq. (Rep)} + \beta_1 h + \beta_2 m + \beta_3 i + \beta_4 hm + \beta_5 hi + \beta_6 mi + \xi$$

Donde:

Y_{ijk} = variable respuesta

μ = media general

Rep = repetición de los tratamientos.

Bloq. (Rep) = bloque dentro de la repetición

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = coeficiente lineal (efecto individual)

$\beta_4, \beta_5, \beta_6$ = coeficiente de la interacción de dos factores

ξ = error experimental.

h = hora de corte.

m = tiempo de marchitamiento.

i= inoculante

Los datos fueron analizados con el programa SAS 9.0®.

3.5 Resultados

3.5.1 Tiempo empleado en las actividades de ensilaje

Los tiempos promedio que se requirieron fueron 33 minutos para cortar con guadaña aproximadamente 160 kg en peso fresco de forraje de cada unidad experimental (un operador) y 12 minutos para juntar, cargar y transportar el forraje (dos operadores). Por su parte, el tiempo empleado para picar ese forraje (un operador) varió entre fases experimentales, 90 ± 19 , 72 ± 14 y 72 ± 23 minutos en las fases uno, dos y tres, respectivamente. Por último, el tiempo utilizado para llenar, compactar y sellar cada silo (dos operadores) fue 139 ± 21 , 118 ± 25 y 115 ± 22 minutos en las en las fases uno, dos y tres, respectivamente

3.5.2 Densidad del forraje

La densidad de forraje ensilado fue en promedio $608 \pm 31 \text{ kg m}^{-3}$ con valores extremos de 542 y 661 kg m^{-3} sin efectos significativos de las combinaciones de fases experimentales, horas de corte, tiempos de marchitamiento y contenido de MS del forraje al momento de ensilar.

3.5.3 pH y capacidad buffer en forraje fresco

Los valores promedio de pH y capacidad buffer del forraje fresco fueron 6.9 ± 0.3 y $339 \pm 50 \text{ meq} \times 10^{-3}$ de ácido láctico, respectivamente, sin efecto de las combinaciones de fases experimentales, horas de corte, tiempos de marchitamiento y contenido de MS del forraje al momento de ensilar.

3.5.4 Contenido de materia seca de forraje al corte y post-marchitamiento

El forraje cortado a las 14:00 h tuvo mayor contenido de MS que el cortado a las 08:00 h en la Fase 1 ($p=0.0029$) y en la Fase 2 ($p=0.0065$), pero no así en la Fase 3 ($p=0.3348$) (Cuadro 3).

No se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre marchitar una o dos horas. El contenido de MS post-marchitamiento no presentó diferencias significativas en la fase uno por efecto del tiempo de marchitamiento, el promedio fue 27%. En las fases dos y tres el forraje con una o dos horas de marchitamiento, cortado a las 14:00 h tuvo mayor contenido de MS que el cortado a las 08:00 h ($p<0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Medias de contenido de materia seca de forraje al momento del corte y post-marchitamiento .

	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Hora de corte	Materia seca al corte (%)		
8:00	23±1.1 ^b	17±0.7 ^b	20±1.1 ^a
14:00	29±1.1 ^a	21±0.7 ^a	22±1.1 ^a
	Materia seca post-marchitamiento		
8:00	27±2 ^a	20±2 ^b	19±1 ^b
14:00	27±2 ^a	24±2 ^a	26±1 ^a

^{ab}Medias con diferente literal dentro de columnas son diferentes ($p\leq 0.05$).

3.5.5 Contenido de proteína cruda, fibra detergente neutro y carbohidratos solubles en alcohol en el forraje fresco

El contenido de proteína cruda no fue afectado por hora de corte y tiempo de marchitamiento en las tres fases, los promedios fueron 18.5±1.2, 16.7±0.7 y 16.0±0.6 en las fases uno, dos y tres respectivamente. El contenido de FDN del forraje cortado a las 08:00 h, en la fase uno aumentó conforme aumentó el tiempo de marchitamiento, en la fase dos no fue afectado por el tiempo de marchitamiento y en la fase tres fue mayor con una hora de marchitamiento; el contenido de FDN del forraje cortado a las 14:00 h en las tres fases se redujo con el tiempo de marchitamiento (Cuadro 4). Por su parte, el contenido de CSA en la fase uno no fue afectado por hora de corte o tiempo de marchitamiento, en tanto que en las fases dos y tres fue mayor en forraje cortado a las 14:00 h.

Cuadro 4. Promedio y error estándar de porcentajes de carbohidratos solubles en alcohol (CSA) y fibra detergente neutro (FDN) en forraje fresco de alfalfa y ovillo.

Hora de corte	Tiempo de marchitamiento (h)	CSA (%)			FDN (%)		
		Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 1	Fase 2	Fase 3
8:00	0	3.8 ^a	3.4 ^b	4.3 ^b	57 ^d	75 ^a	69 ^b
8:00	1	3.5 ^a	3.1 ^b	4.0 ^b	63 ^b	75 ^a	73 ^a
8:00	2	3.3 ^a	3.3 ^b	4.3 ^b	68 ^a	75 ^a	66 ^c
14:00	0	4.3 ^a	3.9 ^a	4.7 ^a	60 ^c	73 ^b	67 ^{bc}
14:00	1	5.1 ^a	4.5 ^a	4.5 ^a	61 ^{bc}	71 ^c	67 ^{bc}
14:00	2	3.8 ^a	4.2 ^a	4.9 ^a	57 ^d	71 ^c	63 ^d
± Error estándar de la media		0.8	0.2	0.2	2.6	1.9	2.1

²Medias sin una letra en común, dentro de columnas^{ab} son diferentes ($p \leq 0.05$)

3.5.6 Temperatura, pH y nitrógeno amoniacal de los ensilados

La temperatura promedio al momento de la apertura de los silos fue de $21 \pm 0.6^\circ\text{C}$ en la fase uno, $20 \pm 0.7^\circ\text{C}$ en la fase dos y $18 \pm 1.1^\circ\text{C}$ en la fase tres. En la fase uno los valores de pH fueron afectados por la interacción hora de corte x inoculante ya que los tratamientos con corte de forraje a las 08:00 h con y sin inoculante presentaron un pH mayor y similar al pH de tratamientos cosechados a las 14:00 h y sin inoculante; en cambio los tratamientos de forraje cosechado a las 14:00 h y con inoculante presentaron menor pH. En las fases dos y tres el efecto principal del factor hora de corte produjo diferencias significativas en pH, siendo menores en ensilados de forraje cosechado a las 14:00 h. (Cuadro 5). El contenido de nitrógeno amoniacal no presentó efectos significativos en las fases uno y dos. En la fase tres, el nivel de N-NH_3 fue afectado por hora de corte y la interacción hora de corte x inoculante (Cuadro 5), los ensilados de forraje cosechado a las 08:00 h con inoculante presentaron mayor contenido de nitrógeno amoniacal que sin inoculante y ambos valores fueron superiores que los de ensilados de forraje cosechado a las 14:00 h.

Cuadro 5. Promedio e interacciones de los factores en pH y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) de ensilados de forraje de alfalfa con ovillo.

EFECTO		pH			N-NH ₃ (% del N total)		
Hora de corte		Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 1	Fase 2	Fase 3
8:00		4.8 ^a	4.9 ^a	4.9 ^a	11 ^a	15 ^a	16 ^a
14:00		4.6 ^a	4.6 ^b	4.7 ^b	10 ^a	14 ^a	13 ^b
Hora x inoculante							
8:00	0	4.7 ^b	4.9 ^a	4.8 ^a	11 ^a	16 ^a	15 ^b
8:00	1	4.8 ^a	4.9 ^a	4.9 ^a	11 ^a	14 ^a	18 ^a
14:00	0	4.8 ^a	4.6 ^b	4.6 ^b	11 ^a	14 ^a	13 ^c
14:00	1	4.4 ^c	4.6 ^b	4.7 ^b	9 ^a	14 ^a	12 ^c

^zMedias sin una letra en común, dentro de columnas^{ab} son diferentes ($p \leq 0.05$).

3.5.7 Carbohidratos solubles en alcohol de los ensilados

El contenido de CSA en ensilados fue reducido con respecto al de forraje fresco (Figura 1). Existieron diferencias significativas entre tratamientos en la fase dos por efecto del factor tiempo de marchitamiento ya que los tratamientos sin marchitamiento mantuvieron 1.2 % de CSA, al exponer al forraje a una hora de marchitamiento el contenido de CSA del ensilado fue de 0.8% y con dos horas de marchitamiento 1.1% de CSA.

3.5.8 Composición nutricional de los ensilados

Proteína cruda

El contenido de PC no presentó diferencias significativas en los tratamientos por efecto de los factores e interacciones de los mismos, en promedio el contenido de PC en la fase uno fue del 18%, en la fase dos 15% y en la fase tres 16%. Las diferencias en PC de ensilados con respecto al forraje fresco fueron pequeñas, en la fase uno el contenido de PC del ensilado fue 0.5% menor, en la fase tres la disminución fue del 1.7% y en la fase tres no existieron cambios.

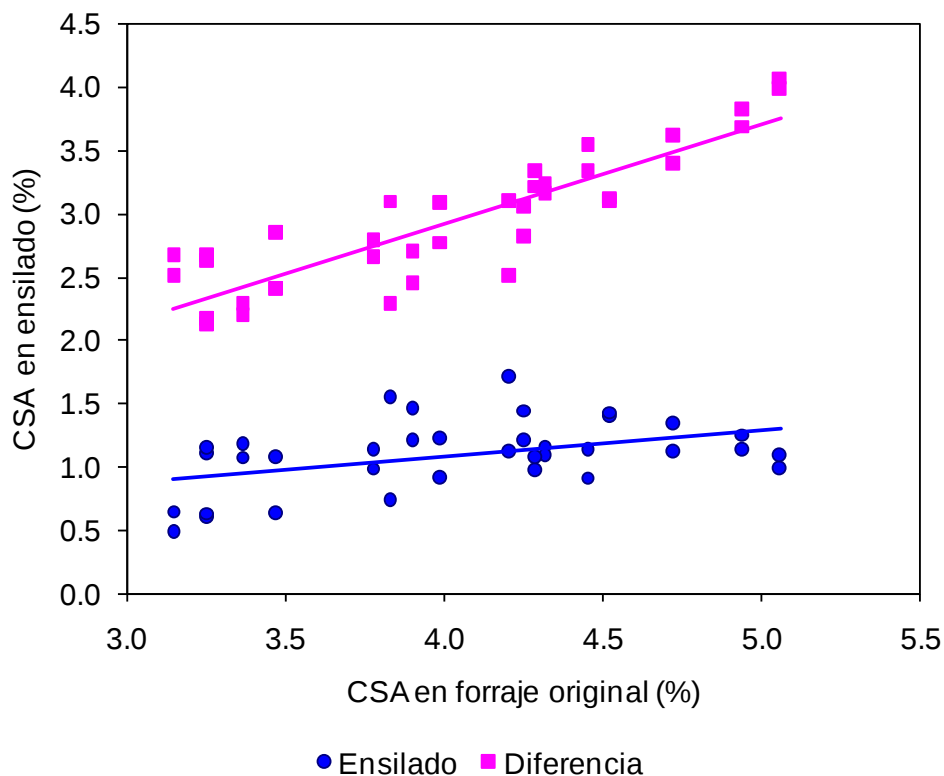


Figura 1. Relación entre el contenido de carbohidratos solubles en alcohol del forraje original y su correspondiente ensilado.

Fibra detergente neutro

En las tres fases el contenido de FDN en ensilados fue aproximadamente 10% menor que el del respectivo forraje fresco. Con relación al efecto de los factores y sus interacciones, en las fases uno y tres el contenido de FDN en el ensilado no presentó diferencias significativas. En la fase dos la interacción de hora de corte $\times$ marchitamiento condujo a diferencias significativas, los tratamientos cosechados a las 14:00 h sin marchitamiento y con una hora de marchitamiento presentaron valores inferiores de FDN que tratamientos cortados a las 08:00 h. Los tratamientos con dos horas de marchitamiento cosechados a las 14:00 h presentaron valores superiores en FDN que tratamientos con el mismo tiempo de marchitamiento pero cosechados las 08:00 h (Cuadro 6).

Cuadro 6. Promedio de contenido de FDN de ensilados de forraje de alfalfa con ovillo por efecto de la interacción hora de corte x marchitamiento en las tres fases del experimento.

Hora de corte	Marchitamiento (h)	FDN (%)		
		Fase 1	Fase 2	Fase 3
8:00	0	47 ^a	59 ^b	63 ^a
8:00	1	48 ^a	61 ^a	64 ^a
8:00	2	45 ^a	54 ^e	60 ^a
14:00	0	48 ^a	57 ^c	62 ^a
14:00	1	50 ^a	56 ^d	65 ^a
14:00	2	51 ^a	61 ^a	59 ^a

²Medias sin una letra en común, dentro de columnas^{ab} son diferentes ($p \leq 0.05$).

3.5.9 Fermentación y desaparición ruminal *in vitro* de los ensilados

Volumen de gas

El volumen de gas no presentó diferencias significativas en la fase uno. En la fase dos el volumen promedio de gas producido en tratamientos cosechados a las 08:00 h fue inferior al volumen alcanzado con tratamientos cosechados a las 14:00 h (Cuadro 7). En la fase tres los volúmenes de gas fueron afectados significativamente por la interacción tiempo de marchitamiento x inoculante, los tratamientos sin marchitamiento y con dos horas de marchitamiento e inoculante alcanzaron volúmenes de gas superiores que los tratamientos sin inoculante. En el caso de tratamientos con una hora de marchitamiento, el valor superior de volumen de gas fue logrado en tratamientos sin inoculante (Figura 2).

Tasa de producción de gas

Esta variable no presentó diferencias significativas en las fases uno y tres. En la fase dos el efecto de la hora de corte marcó diferencias significativas ($p=0.015$), presentándose en los tratamientos de forraje cosechado a las 14:00 h mayores tasas de producción de gas que en tratamientos con corte a las 08:00 h (Cuadro 7).

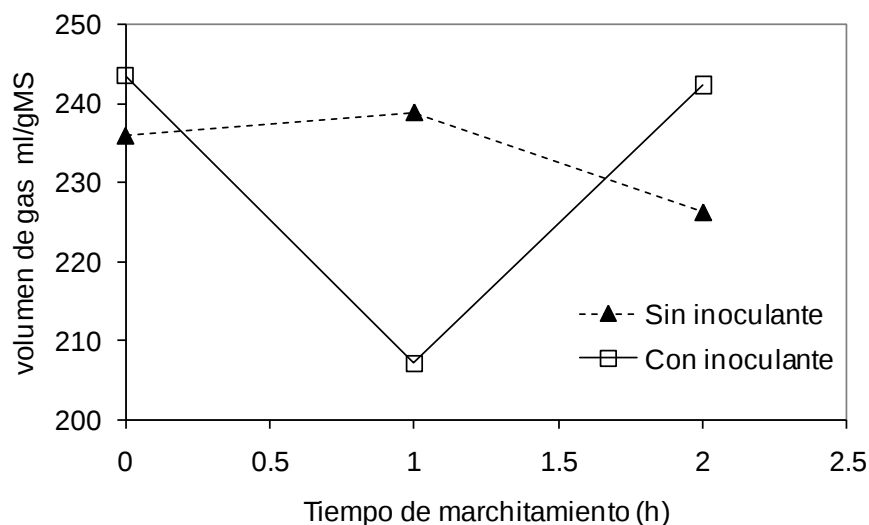


Figura 2. Efecto de la interacción de tiempo de marchitamiento x adición de inoculante sobre el volumen de gas producidos en la digestión *in vitro* de ensilados de alfalfa con ovillo en las tres fases del experimento.

Tiempo de retardo de la actividad fermentativa

En el tiempo de retardo en que las bacterias del rumen iniciaron la producción de gas no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en las diferentes fases (Cuadro 7).

Desaparición ruminal *in vitro*

La desaparición *in vitro* de MS no presentó diferencias significativas entre tratamientos de las fases uno y dos; en cambio, en la fase tres el porcentaje de desaparición fue inferior ($p=0.0378$) en tratamientos cosechados a las 08:00 h (Cuadro 7).

3.5.10 Estabilidad aeróbica de los ensilados

Tasa de cambio de temperatura, pH y CO₂

Las interacciones hora de corte x inoculante e inoculante x marchitamiento afectaron significativamente la tasa de incremento de temperatura y la tasa de incremento de pH d⁻¹ en la fase uno (Cuadro 8). En la primera interacción, el forraje cosechado a las 08:00 h y sin inoculante tuvo tasas de cambio de

temperatura y pH con tendencia a ser inferiores que las tasas de los tratamientos de forraje cosechado a las 14:00 h y sin inoculante; en cambio, en ensilados con inoculante bacteriano el resultado fue contrario al ser mayor la tasa de incremento de temperatura y pH en ensilados de forraje cosechado a las 08:00 h que en ensilados de forraje cosechado a las 14:00 h.

Cuadro 7. Promedio de variables fermentativas y desaparición in vitro de ensilados de alfalfa con pasto ovillo.

Hora de corte	Fase 1	Fase 2	Fase 3
Volumen de gas (ml g⁻¹ MS)			
08:00	218 ^a	193 ^b	227 ^a
14:00	223 ^a	209 ^a	238 ^a
Tasa de fermentación (x10⁻³ h⁻¹)			
08:00	37.1 ^a	37.6 ^b	37.1 ^a
14:00	37.9 ^a	39.9 ^a	36.4 ^a
Tiempo de retardo (h)			
08:00	2.7 ^a	6.8 ^a	5.5 ^a
14:00	2.7 ^a	7.0 ^a	5.2 ^a
Desaparición ruminal in vitro (%)			
08:00	60 ^a	49 ^a	50 ^b
14:00	58 ^a	50 ^a	54 ^a

²Medias sin una letra en común, dentro de columnas^{ab} son diferentes (p≤0.05).

En la interacción de inoculante x marchitamiento los tratamientos sin marchitamiento y sin inoculante presentaron menores tasas (p=0.0066) de cambio de temperatura que los tratamientos con una hora de marchitamiento y con inoculante. En el caso de la temperatura de los tratamientos con dos horas de marchitamiento, los tratamientos sin inoculante presentaron la mayor tasa (p= 0.0118), mientras que en el pH los tratamientos con inoculante tuvieron una tasa más alta (p= 0.125). Los tratamientos cuyos ensilados tuvieron menor estabilidad aeróbica fueron los de una hora de marchitamiento e inoculante y los tratamientos con mayor estabilidad fueron los tratamientos sin marchitamiento e inoculante al presentar bajas tasas de temperatura y pH d⁻¹. Por el contrario en ensilados de forraje con dos horas de marchitamiento los tratamientos con inoculante tuvieron baja temperatura y un pH alto en

comparación de los tratamientos sin inoculante. En las fases dos y tres la tasa de cambio diario de pH por día fue superior en los tratamientos con corte a las 08:00 h que aquellos en corte a las 14:00 h (Cuadro 8). En la fase tres los tratamientos con una hora de marchitamiento presentaron la mayor tasa de cambio de temperatura, seguidos por los tratamientos sin marchitamiento, en los tratamientos con dos horas de marchitamiento este fenómeno fue contrario al reducirse la temperatura a una tasa de -0.03°C .

En la variable producción de CO_2 no existieron diferencias significativas en ninguna de las tres fases, las tasas de producción de CO_2 fueron 9, 9.4 y 19.8 mili moles de $\text{CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS d}^{-1}$ en las fases uno, dos y tres respectivamente.

Cuadro 8. Tasas promedio de temperatura y pH durante el deterioro aeróbico de ensilados de alfalfa con pasto ovillo.

Efecto		Tasa de cambio de temperatura $\text{d}^{-1} (^{\circ}\text{C})$			Tasa de cambio de pH d^{-1}		
Hora de corte		Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 1	Fase 2	Fase 3
08:00		0.16 ^a	-0.26 ^a	0.03 ^a	0.41 ^a	0.9 ^a	0.3 ^a
14:00		0.18 ^a	-0.27 ^a	0.03 ^a	0.31 ^a	0.45 ^b	0.07 ^b
Hora x Inoculante							
08:00	0	0.03 ^c	-0.22 ^a	0.03 ^a	0.18 ^d	0.86 ^a	0.18 ^a
08:00	1	0.29 ^a	-0.29 ^a	0.04 ^a	0.63 ^a	0.95 ^a	0.42 ^a
14:00	0	0.26 ^a	-0.29 ^a	0.01 ^a	0.37 ^b	0.58 ^b	-0.002 ^b
14:00	1	0.09 ^b	-0.26 ^a	0.05 ^a	0.25 ^c	0.32 ^b	0.15 ^a
Inoc x March							
0	0	0.03 ^f	-0.22 ^a	-0.01 ^a	0.33 ^d	0.91 ^a	0.12 ^a
0	1	0.35 ^a	-0.18 ^a	0.10 ^a	0.1 ^e	0.77 ^a	0.05 ^a
0	2	0.11 ^e	-0.37 ^a	-0.03 ^a	0.4 ^c	0.49 ^a	0.09 ^a
1	0	0.23 ^b	-0.29 ^a	0.09 ^a	0.04 ^f	0.72 ^a	0.3 ^a
1	1	0.16 ^c	-0.28 ^a	0.06 ^a	0.84 ^a	0.65 ^a	0.57 ^a
1	2	0.13 ^d	-0.26 ^a	-0.02 ^a	0.45 ^b	0.52 ^a	0.0012 ^a

^zMedias sin una letra en común, dentro de columnas^{ab} son diferentes ($p \leq 0.05$).

3.6 Discusión

Tiempo empleado en las actividades de ensilaje

El tiempo empleado en la compactación fue elevado y muy superior al empleado en las otras actividades. Este resultado coincide con la apreciación de Améndola *et al.* (2009), en el sentido que los requerimientos de mano de obra para la compactación son el cuello de botella para la adopción de tecnologías de ensilaje por pequeños productores.

Densidad del ensilado

La densidad del forraje es clave del éxito del ensilaje, regularmente se considera que 600 kg/m^3 es la densidad mínima recomendable (Améndola *et al.*, 2009) aunque Muck (2010) recomienda una densidad mínima de 700 kg/m^3 , misma que corresponde con una porosidad de 40%. El promedio de resultados de densidad obtenidos con el mecanismo de compactación diseñado, se encontró en el intervalo de valores aceptables. No se encontraron efectos de tratamientos sobre la densidad de forraje, que fue mayor a 600 kg/m^3 , aunque de acuerdo a lo planteado por Améndola *et al.* (2009), se esperaba que los tratamientos cosechados por la mañana y sin marchitamiento, al presentar menor contenido de MS del forraje permitieran lograr mayor densidad.

pH y capacidad buffer del forraje fresco

El pH y la capacidad buffer del forraje fresco no presentaron diferencias significativas por efecto de la hora de corte y tiempo de marchitamiento, el intervalo de pH fue entre 6.5 y 7. Los resultados de capacidad buffer del presente estudio difieren de los publicados por McEniry *et al.* (2007) quienes encontraron que la capacidad buffer en pasto fue alta en el material marchitado y que el picado del forraje previo a ensilar resultó en una reducción de la capacidad buffer en ensilado sin marchitar pero no con ensilados hechos con forraje marchito. Esta diferencia puede ser atribuida a que en el presente experimento el forraje ensilado fue de asociación de

alfalfa-ovillo, y la alfalfa por tener una alta capacidad buffer pudo haber influido en que no se presentaran diferencias entre tratamientos.

Contenido de MS de forraje al corte y post marchitamiento

Los tratamientos cosechados a las 08:00 h presentaron mayor contenido de humedad que los tratamientos cosechados a las 14:00 h (Cuadro 3), este resultado que coincide con lo indicado por Owens *et al.* (2002) se puede deber a que por la mañana la humedad ambiental es mayor, la temperatura ambiente y radiación solar son menores y por tanto la transpiración es aún baja. En tratamientos con corte de forraje a las 08:00 h el tiempo de marchitamientos no afectó el contenido de MS, lo cual probablemente se deba a que en temporada de lluvia la evapotranspiración potencial en horas de la mañana es baja (alta humedad relativa, baja velocidad del viento, baja temperatura). En cambio, coincidiendo con lo reportado por McEniry *et al.* (2007) en los tratamientos de forraje cosechado a las 14:00 h en las fases dos y tres hubo incremento lineal del contenido de MS conforme se incrementó el tiempo de marchitamiento.

Carbohidratos solubles en alcohol en forraje fresco

Los contenidos de CSA de forraje fresco en la fase uno no presentaron diferencias significativas, mientras que en las fases dos y tres los tratamientos de forraje cosechado a las 14:00 h presentaron mayores concentraciones de CSA, lo cual era de esperarse en función de lo reportado por Rizk *et al.* (2005). En cambio el tiempo de marchitamiento no afectó la concentración de CSA como fue encontrado por Hashemzadeh-Cigari *et al.* (2011) quienes detectaron que al marchitar forraje de alfalfa por periodos cortos había un incremento en la concentración de CSA. Por su parte, Jatkauskas *et al.* (2008) encontraron que en alfalfa marchita hasta 32% de MS el contenido de CSA fue 3.7%, similar al encontrado en el presente experimento.

Contenido de proteína cruda y fibra detergente neutro en forraje fresco

El porcentaje de PC no varió por efecto de tratamientos, lo cual era de esperarse ya que no se encontraron reportes de efectos de hora de corte y tiempo de marchitamiento sobre los contenidos de PC del forraje. Respecto al contenido de FDN, los tratamientos de forraje cosechado a las 14:00 h presentaron menores concentraciones de FDN, probablemente debido a la acumulación de los resultados de la fotosíntesis en el contenido celular (Owens *et al.*, 2002). Ello representa ventajas en términos de la composición nutricional y características fermentativas del forraje original (Nadeau *et al.*, 2000a).

Parámetros fermentativos de los ensilados

Temperatura y pH

Las temperaturas de los ensilados, que se encontraron en el intervalo de 18 a 21°C fueron adecuadas, Borreani y Tabacco (2010) reportan que en ensilado bien conservado la temperatura debe de ser cercana a la temperatura ambiente. Ensilados con temperatura mayor a 35°C indican respiración causada por la presencia de oxígeno por deficiente compactación o niveles altos de MS del forraje, adicionalmente este efecto se asocia con fermentaciones indeseables; Kim y Adesogan (2006) observaron que ensilado de maíz con 40°C tuvo una fermentación más restringida, mayor proteólisis y menor relación láctico:acético que ensilado con 20°C.

El pH del ensilado es uno de los principales factores que influencia el grado de proteólisis (Filya *et al.*, 2006); al respecto los resultados del presente estudio (Cuadro 5) no fueron concluyentes ya que los efectos de tratamientos difirieron entre fases sin que fuese posible encontrar explicación para esas diferencias. Los valores de pH fluctuaron entre 4.6 y 4.9, similares a los reportados por Kung y Shaver (2001) para ensilados de forrajes de pastos; en ensilado de alfalfa marchita Jatkauskas *et al.* (2008) detectaron un pH de 4.9 similar a los resultados del presente estudio. En la fase dos fueron menores los valores de

pH de ensilados cosechados a las 14:00 h lo que coincidiría con mayores niveles de contenidos de MS y CSA, condiciones que optimizan la actividad de las BAL y explican la ventaja que tiene cosechar forraje en horas de la tarde (Owens *et al.*, 2002). De acuerdo con Tyrolová y Vývorná (2011) para forrajes con menos de 20% de MS, es necesario acidificar el forraje hasta un pH mínimo de 4.2 y para forrajes con 30% de MS es necesario un pH de 4.45.

Nitrógeno amoniacal

El contenido de nitrógeno amoniacal es de importancia, ya que indica la cantidad de proteína que ha sido degradada a amoníaco. Cuando esta proporción es alta indica que ha habido un mayor desarrollo de bacterias de fermentación butíricas y constituye indicio para conocer la estabilidad del ensilado, pues cuando no existe ácido butírico la proporción de nitrógeno amoniacal es menor a 7% (Nishino y Touno, 2005). En el presente estudio, la concentración de nitrógeno amoniacal fue menor en los tratamientos con forraje cosechado a las 14:00 h con valor promedio de 13%, lo que significa que para disminuir la proteólisis se requería un pH aun más bajo mediante la adición de carbohidratos o mayor contenido de MS a través del marchitamiento, como fue encontrado por Jatkauskas *et al.* (2008) quienes ensilaron alfalfa con 32% de MS e inoculante bacteriano y el contenido de N-NH₃ del ensilado fue de 7.6%. No obstante, las concentraciones de nitrógeno amoniacal del presente trabajo son inferiores a 15%, que es el valor límite establecido por Cavallarin *et al.* (2007), para identificar ensilados de buena calidad.

Contenido de carbohidratos solubles en alcohol en ensilado

La concentración inicial de CSA del forraje original fue en promedio 4.1% y en todos los tratamientos la concentración de CSA disminuyó durante el proceso de fermentación hasta 1% lo que indica que fueron utilizados eficientemente por las BAL (Filya *et al.*, 2006). Si hubiese existido mayor concentración de CSA en

el forraje original, el pH del ensilado hubiese sido aún menor, por lo que la adición de una fuente de carbohidratos altamente fermentables como la melaza sería una buena alternativa.

Proteína cruda

El contenido de PC no presentó diferencias significativas en los tratamientos por efecto de los factores e interacciones de los mismos, el mismo resultado fue encontrado por Jatkauskas y Vrotniakienė (2009) en ensilado de alfalfa marchita.

Cambio del contenido de fibra detergente neutro

En las tres fases el contenido de FDN en ensilados disminuyó 10% con respecto al contenido de FDN del forraje fresco, en la mayoría de los casos conforme se incrementó el tiempo de marchitamiento el contenido de FDN disminuyó entre 3 y 5%, este efecto del marchitamiento en la reducción del nivel de FDN de los ensilados coincide con los resultados de Hashemzadeh-Cigari *et al.* (2011) quienes encontraron que al marchitar pasto ovillo antes de ensilar se incrementó el contenido de MS del forraje y disminuyó el contenido de FDN en 5%.

Desaparición de la materia seca in vitro

La desaparición in vitro de la MS presentó valores promedio de 59, 50 y 52% en las fases uno, dos y tres respectivamente y son inferiores a los valores reportados por Rizk *et al.*, (2005) quienes reportaron que la desaparición ruminal de la MS del ensilado de alfalfa fue en promedio 65%, estas diferencias pueden posiblemente atribuirse a que en el presente estudio el forraje fue de una asociación de alfalfa-ovillo que al tener 42 días de rebrote, tenía un grado de madurez medio a avanzado.

Estabilidad aeróbica de los ensilados

Los ensilados de forraje cosechado a las 08:00 h e inoculados fueron menos estables que ensilados sin inoculante; por el contrario, en forraje cosechado a

las 14:00 h los tratamientos con inoculante presentaron mayor estabilidad. El resultado obtenido con el forraje cosechado a las 08:00 h coincide con lo reportado por Rossi y Dellaglio (2007) quienes en una prueba de estabilidad aeróbica de ensilados encontraron que los que fueron tratados con BAL tuvieron pH alto, alta producción de CO₂ y mayor número de levaduras que otros ensilados, es decir fueron inestables bajo condiciones aeróbicas. También Danner *et al.*, (2002) encontraron mayor estabilidad aeróbica de ensilados sin inocular que ensilados inoculados; los autores observaron que la inoculación de forraje de maíz con BAL homofermentativas condujo a ensilados de baja estabilidad contra el deterioro aeróbico y que un ensilado con pH alto (4.11) tuvo estabilidad mayor (274 h) que ensilados con valores de pH entre 3.8 y 3.9 (26 a 72 h). Sin embargo, no fue posible encontrar explicación para la mayor estabilidad aeróbica de los ensilados cosechados a las 14:00 h e inoculados.

No se detectaron efectos de tratamientos sobre la producción de CO₂ en ninguna de las fases, se sabe que cuando hay alta producción de CO₂ es señal de un alto desarrollo de levaduras y hongos. En una prueba de deterioro aeróbico de ensilado de maíz, Weinberg *et al.* (2002) encontraron diferencias entre inoculantes con *Lactobacillus buchneri* y *L. plantarum* + *L. buchneri* sobre la producción de CO₂; los ensilados control y ensilados con *L. plantarum* produjeron un alto nivel de CO₂ como consecuencia del desarrollo de levaduras y hongos, en cambio el inoculante con *L. buchneri* inhibió a esos microorganismos y la producción de CO₂ disminuyó.

3.7 Conclusiones

El ensilaje de forraje de alfalfa-ovillo cosechado a las 14:00 h fue ventajoso ya que el ensilado presentó mayores contenido de materia seca y carbohidratos solubles en alcohol y menor contenido de fibra detergente neutro.

Los tiempos de marchitamiento del forraje usados en el presente experimento no fueron lo suficientemente largos para generar en la mayor parte de los casos cambios positivos en el forraje para ensilar.

El uso de inoculante bacteriano con enzimas fibrolíticas no produjo ensilados de alfalfa de mayor calidad o estabilidad aeróbica.

3.8 Literatura citada

- Améndola, R., E. Castillo, and P. A. Martínez. 2005. Country Pasture/Forage Resource Profiles.Mexico. <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/Mexico/Mexico.htm> Consultada el día 13 de junio 2012.
- Améndola M., R. D., F. Ojeda G., C. F. Marcof Á., P. A. Martínez H., y L. A. Miranda R. 2009. Ensilaje de forraje para pequeños ganaderos de la Sierra y la Huasteca Hidalguense. Universidad Autónoma Chapingo. p. 16.
- A.O.A.C., 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. 15th Edition. USA. 728 p.
- Borreani, G., and E. Tabacco. 2010. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. Journal of Dairy Science 93: 2620-2629.
- Cavallarin, L., E. Tabacco, and G. Borreani. 2007. Forage and grain legume silages as valuable source of proteins for dairy cows. Italian Journal of Animal Science 6: 282-284.
- Danner, H., M. Holzer, E. Mayrhuber, and R. Braun. 2002. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. Applied and Environmental Microbiology 69:562-567.
- Dubois, M. K., A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analysis Chemistry 28: 350.
- Filya, I., E. Sucu, and A. Karabulut. 2006. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. Journal of Applied Microbiology 101: 1216-1223.
- Guo, X., H. Zhou, Z. Yu, and Y. Zang. 2006. Changes in the distribution of nitrogen and plant enzymatic activity during ensilage of Lucerne treated with different additives. Grass and Forage Science 62: 35-43.
- Han, K. J., M. Collins, E. S. Vanzant and C.T. Dougherty. 2006. Characteristics of baled silage made from first and second harvest of wilted and severely wilted forages. Grass and Forage Science 61: 22-31.
- Hashemzadeh-Cigari, F., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, and A. Taghizadeh. 2011. The effect of wilting, molasses and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerne silage. South African Journal of Animal Science 41:388-378.

- Jasaitis, D. K., J. E. Wohlt, and J. L. Evans. 1987. Influence of feed ion content on buffering capacity of ruminant feedstuffs *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 70: 1391-1403.
- Jatkauskas, J., and V. Vrotniakienė. 2009. The influence of application of a biological additive on the fermentation and nutritive value of lucerne silage. *Zemdirbyste- Agriculture* 96: 197-208.
- Jatkauskas, J., V. Vrotniakienė, B. Lund, and C. Ohlsson. 2008. Lucerne silage fermentation characteristics when adding single strain inoculants. *Grassland Science in Europe* 16: 259-261.
- Kim, S. C., and A. T. Adesogan. 2006. Influence of ensiling temperature, simulated rainfall, and delayed sealing on fermentation characteristics and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science* 89: 3122–3132.
- Knežević, J., M. Milenković, B. Milošević, D. Beković, M. Aksić, and B. Jašović. 2011. Suitability of alfalfa and orchardgrass for ensilage. *Biotechnology in Animal Husbandry* 27: 1315-1320.
- Kozelov, K. L., F. Iliev, N. A. Hristov, S. Zaman, and A. T. McAllister. 2008. Effect of fibrolytic enzymes and an inoculant on *in vitro* degradability and gas production of low-dry matter alfalfa silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88: 2568-2575.
- Kung, L., and R. Shaver. 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. *Focus on Forage* 3: 1-5.
- Mannetje, L.'t., 2000. Silage making in the tropics with particular emphasis on smallholders. *In: proceedings of the FAO Electronic Conference on Tropical Silage, 1 September -15 December 1999, FAO, Rome.* p. 1.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*. 17: 297-304.
- McEniry J., P. O'kelly, N. J. W. Clipson, P. D. Forristal, and E. M. Doyle. 2007. The relative impacts of wilting, chopping, compaction and air infiltration on the conservation characteristics of ensiled grass. *Grass and Forage Science* 62: 470-484.
- Menke, K. H. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28.
- Muck, R.E. 2010. Influencia de los factores de manejo sobre la calidad de los ensilados *In: Memorias del Simposio Lechero Internacional Forrajes: calidad preservación y uso óptimo. Expo Leche San Marcos 2010(comp.), Aguascalientes 21,22 y 23 de abril de 2010.* pp: 1-11.
- Nadeau, E. M., J. R. Russel, and D.R. Buxton. 2000a. Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulose,

- inoculant, and formic acid fed to lambs. *Journal of Animal Science* 78: 2980-2989.
- Neiker-Derio (Laboratorio Agrario Fraisoro). 2002. Interpretación de análisis de ensilados.
<http://www.fraisoro.net/FraisoroAtariaDoku/recomenvaloraciondesilos.pdf>.
 Consultada el 30 de junio del 2012.
- Nishino, N., and E. Touno. 2005. Ensiling characteristics and aerobic stability of direct-cut and wilted grass silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1882-1888.
- Owens, V. N., K. A. Albrecht, and R. E. Muck. 2002. Protein degradation and fermentation characteristics of unwilted red clover and alfalfa silage harvested at various times during the day. *Grass and Forage Science* 57:329-341.
- Rizk, C., A. F. Mustafa, and L. E. Phillip. 2005. Effects of inoculation of high dry matter alfalfa silage on ensiling characteristics, ruminal nutrient degradability and dairy cow performance. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 743-750.
- Rossi, F., and F. Dellaglio. 2007. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1707-1715.
- SAS Institute. 2004. SAS User's Guide: Statistics. Ver. 9.2. SAS Institute. Cary, N.C. USA. 5180 p.
- Sosa de Pro. 1979. Manual de procedimientos analíticos para alimentos de consumo animal. Chapingo, México. 115p.
- Tyrolová, Y., and A. Výborná. 2011. The effects of wilting and biological and chemical additives on the fermentation process in field pea silage. *Czech Journal of Animal Science* 10: 427-432.
- Weinberg, Z. G., G. Ashbell, Y. Hen, A. Azrieli, G. Szakacs, and I. Filya. 2002. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28: 7-11.
- Zehra, S. B., and Unal K. 2011. Effect of different additives on the nutrient composition, *in vitro* gas production and silage quality of alfalfa silage. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advance* 6: 618-626.