

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“EFECTO DE UN INOCULANTE MICROBIANO SOBRE PARÁMETROS
QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS EN SILOS EXPERIMENTALES DE GRANOS
HÚMEDOS DE SORGO”**

“por”

**Marcelo VIERA FREITAS
Gerardo CARDOZO ORELLANO**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Tecnología**

MODALIDAD: Ensayo experimental

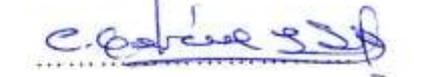
**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:


.....
Dr. Alejandro Britos

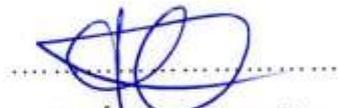
Segundo Miembro (Tutor):


.....
Dra. Carmen García y Santos

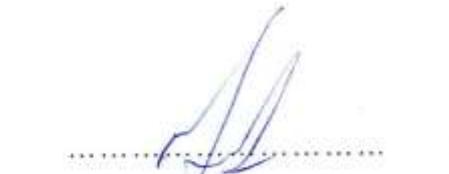
Tercer Miembro:

.....
Dra. Alejandra Capelli

Cuarto Miembro (Co-tutor):


.....
Dr. Álvaro González

Autores:


.....
Br. Gerardo Cardozo Orellano


.....
Br. Marcelo Viera Freitas

Fecha:

21 de Diciembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A nuestra tutora la Dra. Carmen García y Santos por su apoyo, orientación y disposición. Como también al personal de la cátedra de Toxicología de la Facultad de Veterinaria.

- ✓ A nuestro cotutor el Dr. Álvaro González, por sus aportes y disposición.

- ✓ Al Departamento de Ciencia y Tecnología de la leche, por el préstamo de laboratorio y materiales.

- ✓ Al Dr. Fernando Vila, por contribuir a los análisis estadísticos.

- ✓ A nuestras familias, amigos y compañeros por su apoyo incondicional y ayuda en todo momento.

- ✓ A la Facultad de Veterinaria por la posibilidad de formarnos en esta linda y grata profesión.

- ✓ A todo aquel que de una u otra manera contribuyó a la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
CULTIVO DE SORGO	10
Tipos de sorgo.....	11
Momento de la cosecha	12
ENSILAJE	12
EL PROCESO DE ENSILAJE	13
MICROBIOTA DEL SILO	15
BACTERIA ÁCIDO LÁCTICAS	15
MICROORGANISMOS INDESEABLES- FERMENTACIONES SECUNDARIAS	17
HONGOS	18
EFFECTO DEL pH DEL ENSILAJE	20
ESTABILIDAD AÉROBICA DE ENSILAJES	20
ADITIVOS PARA ENSILAJES	21
Estimulantes de la fermentación	21
Inoculantes microbianos	21
Enzimas	23
Azúcares (melaza)	23

Inhibidores de la fermentación	24
Inhibidores de deterioro aeróbico	24
Nutrientes	25
Absorbentes	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
ACTIVIDADES DE CAMPO	27
ANÁLISIS QUÍMICOS	27
DISEÑO EXPERIMENTAL	28
PROCEDIMIENTOS Y DETERMINACIONES EN SILOS EXPERIMENTALES DE LABORATORIO.....	28
EVALUACIÓN DE pH	28
DETERMINACIÓN DE MATERIA SECA	28
ENUMERACIÓN DE BAL	28
AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS Y LEVADURAS	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
Cuadro I. Características principales de la variedad del sorgo utilizado en el experimento.....	27
Cuadro II. Composición química de los granos de sorgo del experimento evaluados previamente al ensilaje.....	28
Cuadro III. Efecto del inoculante sobre pH, MS, hongos totales, levaduras y <i>Penicillium</i> en granos de sorgo de silos experimentales.....	30
Cuadro IV. Valores de BAL expresados en Log UFC/g de silos con inoculante y sin inoculante.....	31
Cuadro V. Correlaciones entre materia seca, pH, poblaciones de hongos, levaduras y <i>Penicillium</i> de silos experimentales de grano húmedo de sorgo con y sin inoculante.....	31
 Figuras	
Figura 1. Fases del ensilado.....	14

RESUMEN

El objetivo de este trabajo, fue evaluar el efecto del agregado de un inoculante microbiano comercial sobre parámetros químicos y microbiológicos de granos de sorgo húmedo almacenados en silos experimentales de laboratorio durante 180 días. Con este fin, se obtuvo una muestra de sorgo de un establecimiento comercial, al momento del ensilaje durante el llenado de silo-bolsas. Se elaboraron 20 silos experimentales de laboratorio en envases plásticos, herméticos, con capacidad de 3 kg. A 10 silos se les aplicó un tratamiento con inoculante, mientras los 10 restantes se utilizaron como control. Se evaluaron pH, materia seca, concentración de bacterias ácido lácticas (BAL), hongos totales, levaduras y géneros toxicogénicos. Los resultados de pH, MS, recuento de BAL, hongos totales, levaduras y *Penicillium* fueron comparados entre tratamientos (con y sin inoculante) por análisis de varianza ANOVA y se buscaron correlaciones entre los parámetros analizados. Los silos tratados y controles presentaron diferencias significativas en la MS (72.05 vs 69.34 ± 3.8 P=0.003) y en las concentraciones de BAL (7.39 vs 6.71 ± 0.28 P=0.04). Los demás parámetros no fueron afectados por el inoculante. La MS y el pH se correlacionaron negativamente (r=-0.520; P=0.019). Las levaduras también se correlacionaron negativamente con pH (r=-0.542; P=0.014) y positivamente con las poblaciones de hongos (r=0.577; P=0.008). En cuanto al género *Penicillium*, se correlacionó negativamente con los hongos (r=-0.452; P=0.026), presentando alta correlación positiva con las levaduras (r=0.896; P=<.0001). En conclusión el inoculante comercial utilizado en este experimento disminuyó la MS e incrementó el recuento de BAL.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of inoculant addition on chemical and microbiological parameters of experimental silo wet grain sorghum stored for 180 days. Sorghum grains samples were obtained from a farm and ensiled in 20 experimental silos. Half of the silos were treated with a commercial inoculant and the others were used as controls. Dry matter (DM), pH, lactic acid bacteria (LAB), fungal population, yeast and toxicogenic mold were evaluated. ANOVA statistical analysis and correlations were done. Among the treated and control silos, significant differences were observed in DM (72.05 vs 69.34 ± 3.8 P = 0.003) and in LAB count (7.39 vs 6.71 ± 0.28 P = 0.04). Other parameters were not affected by the inoculant. DM and pH were negatively correlated (r = -0.520; P = 0.019). Yeasts were also negatively correlated with pH (r = -0.542; P = 0.014) and positively correlated with mold populations (r = 0.577; P = 0.008). *Penicillium* genus was negatively correlated with other mold (r = -0.452; P = 0.026), but showing high positive correlation with yeasts (r = 0.896; P = <.0001). In conclusion, the inoculant used in this experiment decreased DM and increased the LAB count.

INTRODUCCIÓN

Una de las estrategias tecnológicas utilizadas en alimentación animal, es la utilización de ensilajes, complementando o sustituyendo las pasturas naturales cuando estas son escasas. Entre estas estrategias, el ensilado húmedo es un método de conservación en donde las bacterias ácido lácticas (BAL) en condiciones anaeróbicas convierten carbohidratos solubles en agua y ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Como resultado el pH disminuye y el alimento húmedo evita el deterioro por microorganismos alterantes (McDonald y col., 1991). Si bien esta tecnología está disponible en Uruguay desde hace tiempo, en las últimas décadas su uso se ha visto incrementado (Rovira y Velazco, 2012).

Entre los granos más utilizados en la alimentación del ganado, se encuentran maíz y sorgo. Es particularmente este último que se ha visto favorecido en parte por el precio en relación a otros cereales como maíz y en parte por sus características de cultivo, por lo que ha aumentado su área de siembra. Es por estos motivos, que se ha visto que la superficie destinada al cultivo de sorgo granífero en los últimos 15 años, ha pasado de 12.428 hectáreas sembradas y 19.942 toneladas de grano producidas en la zafra 1999/2000 (DIEA, 2015) a 81.700 hectáreas de sorgo sembradas y 326.800 toneladas de grano producido en la zafra 2014/2015 (DIEA, 2015).

Uno de los principales destinos del sorgo granífero es la elaboración de ensilajes de grano húmedo (Rovira y Velazco, 2012). Este tipo de reserva forrajera puede realizarse en silos tipo torta, trinchera, silos verticales o silos tipo bolsa (silo-bag), siendo ésta última la opción más difundida en Uruguay. El silo-bolsa tiene como ventajas, la facilidad operativa, baja inversión relativa y buenas condiciones de conservación (Chalkling y Brasesco, 2003). Para mejorar el proceso de ensilaje, se pueden aplicar aditivos que contribuyan a la creación de condiciones óptimas que permiten mejorar la conservación y el valor nutritivo del alimento resultante (Argamentería y col., 1997).

El estudio del proceso de ensilado, simulando la conservación de forrajes u otros alimentos en silos de campo, también se puede realizar en silos experimentales. Estos silos permiten realizar todos los análisis necesarios para caracterizar las fermentaciones que tienen lugar, realizar análisis estadísticos y así establecer el marco teórico de los tratamientos estudiados. Además, permiten discriminar variantes, como las ambientales y reducir el espectro de muestras a evaluar. Se clasifican en dos grupos, silos de laboratorio con capacidad aproximada de 1 a 30 Kg de materia fresca (MF) y los silos piloto, con capacidad entre 200 y 5000 kg de MF (Ojeda y col., 1990).

En el presente trabajo se elaboraron un total de 20 silos experimentales de granos húmedos de sorgo en envases de plástico herméticos de 3 kg de capacidad. De estos, a 10 se adicionó un inoculante microbiano, mientras que el resto fueron utilizados como grupo control. El objetivo fue determinar el efecto del agregado de un inoculante microbiano comercial sobre materia seca, pH, recuento de BAL y poblaciones fúngicas totales y toxicogénicas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Cultivo de Sorgo

El sorgo es una gramínea de origen tropical adaptada por mejoramiento genético a diversos ambientes (Zamora, 2007). A pesar de ser un cultivo muy antiguo, es a partir de fines del siglo XIX que alcanza un mayor desarrollo en diferentes regiones agrícolas del mundo (Veiga, 1986). Particularmente en Uruguay el cultivo de sorgo ha tenido un incremento importante en los últimos 15 años, pasando de 12.428 hectáreas sembradas y 19.942 toneladas de grano producidas en la zafra 1999/2000 (DIEA, 2003) a 81.700 hectáreas de sorgo sembradas y 326.800 toneladas de grano producido en la zafra 2014/2015 (DIEA, 2015).

La importancia del sorgo como parte integral de los sistemas productivos, radica en su utilización como alimento animal (Mari, 2003). Entre sus ventajas presenta mayor resistencia frente a condiciones adversas del suelo y stress hídrico, lo que le permite implantarse en suelos no aptos para el maíz. Son sus numerosas raíces fibrosas y ramificadas (Irigoyen y Perrachon, 2007), que le confieren estas ventajas agronómicas y le permiten una alta eficiencia en la utilización de nutrientes (Siri, 2004). Además, su costo relativo es menor en relación al del grano de maíz (DIEA, 2015).

La estructura del grano de sorgo se compone de tres partes: pericarpio que es la capa protectora que lo recubre (8% de la materia seca (MS)), embrión o germen (7 a 12% de la MS) y el endospermo que es el tejido que almacena el almidón (80 a 85% de la MS) (Evers y col., 1999). Los granos están constituidos por proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales, fibra, cenizas y compuestos fenólicos (taninos), en porcentajes variables según genotipo y ambiente. El contenido de proteína varía entre el 5 al 19,3 %, en su mayoría son kafirinas de baja solubilidad y valor nutricional debido a la carencia de aminoácidos esenciales (Seckinger y Wolf, 1973). El contenido de lípidos es de 3 a 4%, siendo básicamente insaturados como el ácido oleico y linoleico (Domanski y col., 1997). Su alto contenido de almidón, 70 a 80% de MS, lo hace rico en energía 3.0 a 3.2 Mcal/Kg (Vallati, 2011). Los contenidos de fibra, minerales y vitaminas del grano de sorgo son bajos (Ruskin y col., 1996).

Una de las características que diferencian el grano de sorgo del resto de los cereales, es la presencia de taninos. Éstos son compuestos fenólicos de alto peso molecular (500 a 3000 Dalton), son metabolitos secundarios de las plantas (Kumar y Vaithyanathan, 1990). Existen dos grupos de taninos, hidrolizables y condensados (Reed, 1995). Estos últimos sirven como defensa química contra pájaros, insectos, la colonización de hongos y acción del clima (Waniska, 2000).

Tipos de sorgo

La elección del tipo de sorgo va a depender del objetivo de producción, ya sea pastoreo directo y fardos o para ensilaje y grano. En los primeros se utilizan las variedades de sudán y sus híbridos, mientras que, para ensilaje y grano, son utilizados los híbridos doble propósito graníferos-forrajeros (Carámbula, 2007).

Sorgos forrajeros: Se caracteriza por producir un volumen importante de forraje para pastoreo o conservación, con elevada producción de MS, baja proporción de grano, alta capacidad de rebrote y macollaje (Coria, 2008). A su vez dentro de éste grupo encontramos sorgos con características que los diferencian como son:

Azucarados: caracterizados por poseer alto contenido de azúcar en tallos, de gran altura (1,70 a 3,50 m) con altos rendimientos en MS (Carámbula, 2007). Debido al mayor contenido de azúcares presentan alta calidad y palatabilidad, con una aceptable producción de grano. Lo que los hace aptos para el pastoreo directo, uso como diferidos y elaboración de reservas como rollos o ensilaje (Coria, 2008).

Fotosensitivos: son híbridos mejorados caracterizados por su extenso período vegetativo y gran volumen de forraje. Tienen buena aptitud para el pastoreo, en óptimas condiciones ambientales para el cultivo pueden alcanzar hasta 4 metros de altura (Coria, 2008).

Nervadura marrón (BMR): presentan entre un 30 y un 50 % menos de lignina (componente de la pared celular totalmente indigestible por los rumiantes) en hojas y tallos, lo cual significaría una ganancia de hasta 10 % en la digestibilidad de la MS. Lo que lo hace apto para el pastoreo directo y para la confección de ensilaje (Marinissen y Melin, 2009).

Sudán: sorgos con altas producciones de MS por hectárea, elevada capacidad de rebrote, macolladores y de baja proporción de grano. Son los más adaptados para el pastoreo directo (Marinissen y Melin, 2009).

Graníferos: presentan alto potencial para producir grano, de bajo aprovechamiento en pastoreo directo. Presentan buena aptitud para ensilar. Un 30-65% del rendimiento de estos sorgos corresponde al componente grano (Coria, 2008).

Doble propósito (DP): se caracterizan por contar una altura intermedia (1,60- 2,30m), más macolladores y foliosos. Son capaces de producir un importante volumen de MS por hectárea, con una proporción muy alta de granos en su composición (Lus, 2009).

Sileros: son una combinación entre sorgos graníferos y forrajeros azucarados generando una aceptable relación hoja, tallo, panoja, que permite generar un buen ensilado, de buena producción de MS por hectárea y aceptable calidad intrínseca (Coria, 2008).

Momento de la cosecha del sorgo

Para la elaboración de silo de grano húmedo es importante la humedad que presenta el grano en el campo, siendo óptima entre 28 y 35%. Cuando el grano alcanza este porcentaje de humedad se produce la madurez fisiológica, momento en el que se interrumpe la comunicación entre planta y grano. Esta etapa se caracteriza por presentar el máximo peso seco, con la cantidad más elevada de carbohidratos y nitrógeno (Owens y col., 1997). En este nivel de humedad se dan los procesos de fermentación que permitirán la conservación de la calidad del grano ensilado. Por éste motivo el momento de la cosecha debe ser correctamente identificado, en general es cuando se observa un punto negro en la inserción del grano. Este es producto de la muerte del tejido vascular y nos indica que a partir de este momento ya comenzó el proceso de deshidratación del grano (Scarpitta, 2008).

El retraso de la cosecha, luego que el grano ha madurado, puede implicar pérdidas de rendimiento, por daños del ambiente (pájaros, inclemencias climáticas, pérdidas de plantas), acción de la cosechadora (mayores pérdidas cuanto más seco) y además por menor calidad del grano al disminuir el contenido proteico y la calidad de almidones (Carrasco, 1990). Al cosechar con humedad muy elevada, podría obtenerse menor cosecha por hectárea, por no haberse completado el llenado del grano y podrían surgir dificultades en la cosecha. En contrapartida, la cosecha con humedad inferior al 28%, estaría reduciendo la ventaja de cosecha anticipada. Además, a medida que disminuye el contenido de humedad, el valor nutritivo del grano es menor y la fermentación del silo se hace más difícil (Romero y col., 1996).

El grano de sorgo tiene el potencial para producir un excelente ensilaje ya que dispone de suficiente cantidad de azúcares simples que son utilizados como sustrato por las bacterias anaeróbicas para la producción principal de ácido láctico. Además, contiene niveles bajos de proteína cruda, nutriente que en altas concentraciones actúa entorpeciendo el rápido descenso del pH (Rovira y Velazco, 2012).

Ensilaje

Es una herramienta técnica que permite transferir alimento de épocas de mayor potencial de producción a otras de menor potencial (Scarpitta, 2008). El ensilaje es un conjunto de procesos bio-físico-químicos a que se somete el forraje verde hasta la obtención de un producto estable. Esto se logra por medio de una fermentación láctica en condiciones anaeróbicas, por aumento de acidez debido a la generación y acumulación de ácido láctico que inhibe la presencia de microorganismos de la putrefacción (Rovira y Velazco 2012). Una vez transcurrido el tiempo de fermentación natural, se obtiene el silaje, alimento húmedo voluminoso de forraje verde y/o grano húmedo, contenido en el silo (Benintende y Hass, 2010).

El ensilaje de grano húmedo puede realizarse en silos tipo torta, trinchera, silos verticales o silos tipo bolsa (silo-bag), siendo ésta última la opción más difundida en Uruguay. El silo-bolsa tiene como ventajas, la facilidad operativa, baja inversión relativa y buenas condiciones de conservación (Chalkling y Brasesco, 2003).

A modo de estudio, se pueden utilizar silos experimentales, que pueden ser de laboratorio con capacidad aproximada de 1 a 30 Kg de materia fresca (MF) o silos piloto, con capacidad entre 200 y 5000 kg de MF. Se pueden elaborar con diferentes materiales, PVC, vidrio, acero y pueden contener válvula para facilitar la colecta de efluentes y liberación de gases. Las ventajas en relación a los silos de campo, son su menor tamaño, mayor número de muestras a estudiar, poder contar con elevado número de tratamientos, reducción de costos y permiten discriminar variantes, como las ambientales (Ojeda y col. 1990).

El proceso de ensilaje

El ensilaje como proceso puede dividirse en cuatro fases, una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire (Merry y col., 1997):

Fase I – Fase aeróbica: Esta fase comprende el período cosecha-ensilaje y es determinante en la calidad final del silo. Luego del picado y ensilado, el oxígeno atmosférico presente en la masa ensilada disminuye rápidamente debido a la respiración de los granos y a los microorganismos aerobios y aerobios facultativos como levaduras y enterobacterias (OudeElferink y col., 2001). La duración de esta fase es de unas pocas horas y depende principalmente de la cantidad de oxígeno disponible. Esto es importante para suprimir la actividad de bacterias aerobias que son indeseables en el proceso de fermentación (Knický, 2005). Por lo tanto, cuanto menor sea el intervalo cosecha-ensilaje y mejor sea la compactación, menor será la pérdida de nutrientes por respiración y las bacterias lácticas tendrán más sustrato para actuar; posibilitándose así una mejor conservación (Barnes y col., 2003).

En caso de que el período de exposición al aire se prolongue, se corre el riesgo de que se produzca una excesiva respiración aumentando la temperatura del grano lo que puede llevar a la desnaturalización de la proteína. Para optimizar esta fase se debe atender especialmente las prácticas de manejo que permiten obtener las menores pérdidas posibles. Se debe tener en cuenta la humedad de la cosecha, disminuir el tiempo entre cosecha y ensilado, realizar un correcto procesamiento del grano, rápido llenado del silo, buena compactación del material y buen sellado de la estructura. En esta fase el nivel de pH es de 6,5 a 6,0 (Chalkling y Brasesco, 2003).

Fase II – Fase de fermentación: Comienza cuando ha desaparecido el aire del silo (OudeElferink y col., 2001). A medida que el oxígeno es removido y la fermentación comienza, las bacterias predominantes son las aerobias facultativas. Estas convierten azúcares en una variedad de ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico y algunas veces ácido butírico), dióxido de carbono (CO₂) e hidrogeno (H₂). Estos ácidos son responsables por la disminución temprana del pH del silo, lo que lleva a un cambio en la población bacteriana. Se produce el desarrollo de bacterias ácido lácticas (BAL), responsables de la producción de ácido láctico, fundamental para obtener una adecuada conservación (Gomes de Araújo, 2008).

La producción de ácido láctico lleva a una disminución más rápida del pH. Dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones en el momento del ensilado esta fase puede durar desde una semana hasta más de un mes (Merry y col., 1997). Es la fase más larga y se extenderá hasta que el pH baje a 4-4,5 (Chalkling y Brascosco, 2003).

Fase III- Fase de estabilización: Al alcanzar ese pH 4-4,5 la mayoría de los microorganismos de la fase anterior lentamente reducen su presencia (OudeElferink y col., 2001). El medio se estabiliza y el material ensilado se conserva sin perder más calidad. Es importante tener en cuenta que el nivel de pH del silo es un buen indicador de la calidad y tipo de fermentación ocurrida. El pH final del silo depende en gran medida del material ensilado, en el caso del silo de sorgo húmedo el pH óptimo se encuentra entre 4 y 4.5 (Chalkling y Brascosco, 2003).

Fase IV- Fase de deterioro aeróbico: Esta fase comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el ensilaje. El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. Esto induce un aumento en el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro; en ella se constata un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, como algunos bacilos. La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aeróbicos, también facultativos, como mohos y enterobacterias. El deterioro aeróbico ocurre en casi todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire. Sin embargo, la tasa de deterioro depende de la concentración y de la actividad de los organismos que causan este deterioro en el ensilaje (Honig y Woolford, 1980).

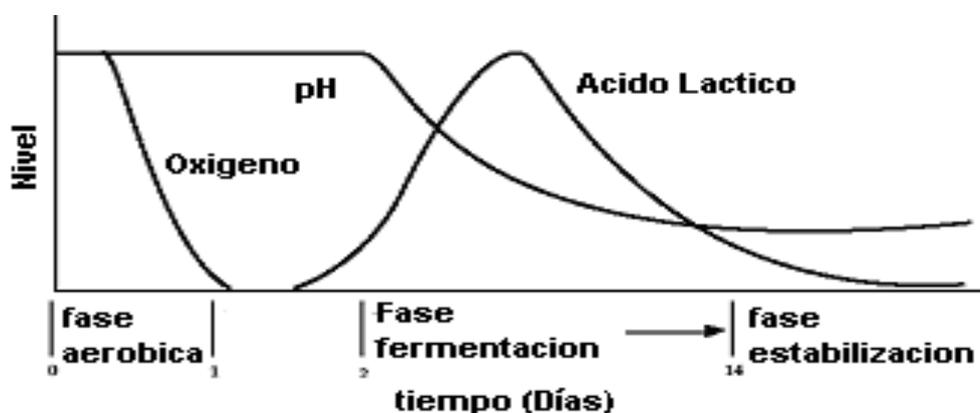


Figura 1. Fases del ensilado (Fuente: Pitt y Shaver, 1990).

Para evitar fracasos al ensilar un material, es importante controlar y optimizar el proceso de ensilaje de cada fase. Las buenas prácticas en la **Fase I** implican una rápida compactación y eliminación del aire, minimizando los procesos de respiración y pérdida de nutrientes, por lo que se debe ajustar la operativa de cosecha, tamaño de partícula (picado), proceso de compactación y sellado del silo; para así llegar con la mayor proporción posible de nutrientes a la fermentación láctica de la **Fase II** (Sewell y Wheaton, 1999). Durante las **Fases II y III** se tienen pocos medios para controlar el proceso de fermentación. Pero se puede recurrir al uso de aditivos que se aplican al momento de ensilar (Chalkling, 2004).

Para minimizar el deterioro en la **Fase IV**, durante el almacenaje es preciso asegurar un silo hermético; reparar las roturas de la cobertura del silo. Durante el suministro puede minimizarse el deterioro manejando una rápida distribución (recomendándose una velocidad de avance en el frente de extracción del silo de unos 20 cm diarios en invierno y 30 cm en verano (Gaggiotti y col., 2001).

Microbiota del silo

El éxito del proceso de conservación de alimentos ensilados depende en parte de la microbiota que se halla presente. Los principales microorganismos en las plantas son bacterias productoras de ácido láctico (BAL), enterobacterias, levaduras y mohos. La microbiota total, en forrajes frescos, antes del ensilaje, varía entre 10^5 y 10^9 UFC/g⁻¹ de forraje (Pahlow y col., 2003). La población natural juega un papel clave para el éxito del proceso de conservación. Pueden dividirse en dos grupos principales, los microorganismos benéficos y los indeseables. Los benéficos son bacterias que producen ácido láctico (BAL) (Titterton y col., 2001). Los indeseables, causan deterioro anaeróbico como clostridios y enterobacterias o deterioro aeróbico como levaduras, bacilos, *Listeria* spp. y mohos. Muchos de estos reducen el valor nutritivo del ensilaje y pueden además afectar la salud de los animales como es el caso de *Listeria monocytogenes* o *Clostridium botulinum* (OudeElferink y col, 2001).

Bacterias ácido lácticas

La mayoría son mesófilos, o sea que pueden crecer en un rango de temperaturas que oscila entre 5° y 50°C, con un óptimo entre 25° y 40°C. Son capaces de bajar el pH del ensilaje a valores entre 4 y 5, dependiendo de las especies y del tipo de forraje. Todos los miembros del BAL son aerobios facultativos, pero muestran cierta preferencia por la condición anaeróbica (Hammes y col., 1992). Las BAL juegan un rol importante durante el proceso de fermentación, estas bacterias fermentan los carbohidratos hidrosolubles del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético (Merry y col., 1997).

El número de BAL presentes en diferentes forrajes puede variar de 10^4 - 10^5 UFC/g (unidad formadora de colonias/gramo) de materia verde (MV) (Cussen y Neira, 1998). Cussen y Neira (1998) indican que hay un incremento de las BAL durante el período comprendido entre la cosecha y la confección del ensilaje. Esto ocurre en cultivos densos y voluminosos, con alta humedad ambiental, baja intensidad lumínica y temperaturas cálidas.

Características inherentes al material a ensilar, como MS y carbohidratos solubles, junto a características de las BAL, como velocidad de desarrollo, tolerancia al pH y osmotolerancia, influyen en la competencia con la microbiota acompañante. La prevalencia de las BAL durante el proceso de fermentación asegura un valor óptimo de pH limitando el desarrollo de microorganismos indeseables (McDonald y col., 1991; OudeElferink y col., 1999).

Con base en su metabolismo de los azúcares, los miembros BAL pueden ser clasificados como homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas (McDonald y col., 1991). Los homofermentadores obligatorios producen más del 85% del ácido láctico a partir de hexosas (azúcares C₆) como la glucosa, pero no pueden degradar las pentosas (azúcares C₅) como la xilosa (Hammes y col., 1992; Schleifer y Ludwig, 1995); e incluyen los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y algunos *Lactobacillus* (Aarnikunnas, 2006).

Los heterofermentadores facultativos producen ácido láctico a partir de la glucosa y pueden degradar pentosas produciendo ácido láctico, etanol y/o ácido acético. El mayor número de especies que presenta este tipo de fermentación pertenecen al género de *Lactobacillus* con un aproximado de 12 especies, dentro del género *Pediococcus* existen 5 especies identificadas con la capacidad de realizar la fermentación mediante las rutas metabólicas mencionadas (Stiles y Holzapfel, 1997).

Los heterofermentadores obligatorios fermentan las hexosas a ácido láctico, CO₂ y etanol y/o ácido acético y las pentosas son degradadas a ácido láctico y ácido acético. Los heterofermentadores obligatorios incluyen miembros del género *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* como *L. brevis* y *L. buchneri* (Hammes y col., 1992). En los ensilajes las BAL más deseables son las homofermentativas debido a que hacen un uso eficiente de los carbohidratos, produciendo exclusivamente ácido láctico y por lo tanto provocando una fuerte caída en el pH (Cussen y Neira, 1998).

A las BAL se les atribuye un alto poder antimicrobiano, no solo debido a la acidificación del medio, sino porque muchos de los ácidos que producen, actúan directamente sobre diferentes microorganismos, produciendo además una serie de sustancias con efectos antimicrobiales reportados como butanona, 3-hidroxi propionaldehído, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y algunos péptidos como la bacteriocina (Broberg y col., 2007).

Microorganismos indeseables - Fermentaciones secundarias

Enterobacterias: también llamadas coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterococcus*), varían en los forrajes de 10^3 - 10^7 UFC/g MV (McDonald y col., 1991). Se encuentran presentes en el tracto digestivo de los animales y del hombre. Son bacterias anaerobias facultativas, los factores que determinan su crecimiento en el ensilaje, son un pH entre 5,5-7, presencia de oxígeno y la presencia de carbohidratos. Como resultado de la fermentación de carbohidratos producen principalmente ácido acético y etanol. Si bien la mayoría de las enterobacterias que pueden estar presentes en un ensilado no son patógenas, establecen una competencia con las BAL por los azúcares y degradan las proteínas. Esto provoca una reducción del valor nutritivo del alimento por la merma de las proteínas del ensilado y por la formación de compuestos tóxicos (aminas biógenas) como producto de la degradación proteica. Este proceso degradativo altera la palatabilidad del alimento (Mc Donald y col., 1991; Van Os y Dulphy, 1997). Además, el amoníaco (NH_3) producido en este proceso actúa como buffer provocando un aumento del pH y debilitando el efecto inhibitor sobre especies nocivas (Woolford, 1984). Las prácticas de un adecuado ensilaje que favorezcan un rápido y significativo descenso de pH en el ensilaje inhiben el desarrollo de estas bacterias (McDonald y col., 1991, OudeElferink y col., 2001).

Bacilos son microorganismos Gram positivos, aerobios facultativos de forma cilíndrica que forman esporas (OudeElferink y col., 2001). Pueden fermentar hidratos de carbono y producir etanol, glicerol, 2,3-butanodiol y ácidos orgánicos incluyendo lactato. Sin embargo, la producción de ácido láctico por bacilos no es eficiente como la de las BAL (McDonald y col., 1991), y además en las etapas finales incrementan el deterioro aeróbico (Lindgren y col., 1985). Por esta razón la proliferación de bacilos en los ensilajes debe ser evitado, tratando de mantener las condiciones de anaerobiosis y reducir toda contaminación inicial del ensilaje con tierra o estiércol (McDonald y col., 1991).

Clostridios son bacterias anaeróbicas que forman endosporas. Muchas de ellas pueden fermentar tanto carbohidratos como proteínas, por lo cual disminuyen el valor nutritivo del ensilaje y crean problemas al producir aminas biogénicas (OudeElferink y col., 2001). Clostridios sacarolíticos que fermentan hidratos de carbono incluyen a *Clostridium tyrobutyricum* y *C. butyricum*, especies regularmente aisladas a partir de ensilaje. El *C. tyrobutyricum*, un organismo ácido tolerante, además de poder fermentar carbohidratos, también puede degradar el ácido láctico en ácido butírico, H_2 (Dihidrógeno) y CO_2 (Dióxido de carbono) (Gibson, 1965). Un típico ensilaje con clostridiales es caracterizado por un alto contenido de ácido butírico, un pH alto, mayor a 5 y un alto nivel de amoníaco y aminas (Kleter y col., 1982, Huchet y col., 1995). Para evitar la presencia de estas bacterias, es necesario lograr una acidificación rápida, mantener la temperatura baja y la estabilidad del ensilaje a un punto crítico de pH 4-4.5 (Barnes y col., 2003).

Los clostridios pueden causar problemas de salud, particularmente una especie extremadamente tóxica es *Clostridium botulinum* que provoca el botulismo. Esta es una enfermedad de origen tóxico de los animales domésticos y el hombre, causada por la ingestión de toxinas producidas por el *C. botulinum*. Debido a su baja tolerancia

a medios ácidos, estas bacterias no se desarrollan en ensilajes bien fermentados. Su presencia en ensilajes corresponde casi siempre a la descomposición de cadáveres de pájaros, ratones entre otros (Gevehr y Riet-Correa y col., 2007).

Bacterias productoras de ácido acético: Son ácido tolerante y aeróbicas obligatorias, hasta ahora todas las bacterias ácido acéticas que se han aislado del ensilaje son pertenecientes al género *Acetobacter* (Spoelstra y col., 1988). La actividad del *Acetobacter* spp. en el ensilaje es indeseable ya que estas bacterias pueden iniciar un deterioro aeróbico, oxidando lactato y acetato para producir CO₂ y agua (Chalkling, 2004).

Listeria: Los integrantes del género *Listeria* son organismos aerobios o anaerobios, móvil, Gram positivas, no esporuladas, saprófito que vive en el suelo y plantas. Se puede encontrar también en las secreciones de animales aparentemente sanos. La especie más importante en vista de la calidad del ensilaje es *Listeria monocytogenes*, una especie anaerobia facultativa y patógena tanto para los animales como para el hombre. El desarrollo y supervivencia de *L. monocytogenes* en el ensilaje están determinados por fallas en asegurar un ambiente anaeróbico, y por el valor de pH del ensilaje. Puede tolerar bajos niveles de pH entre 3,8 a 4,2 por largos períodos siempre que exista oxígeno, aún a exiguas concentraciones. La contaminación con *Listeria* usualmente penetra pocos centímetros dentro del ensilaje, pero esta capa contaminada puede contener una gran cantidad de bacterias. Una de las formas más comunes de presentación es por consumo de restos de ensilaje que han quedado de un año para otro. Hasta el momento, el mejor método para prevenir su desarrollo es mantener un ámbito anaeróbico (McDonald y col., 1991).

Hongos

Se dividen en unicelulares o levaduras y pluricelulares o mohos (McDonald y col., 1991). Las levaduras son microorganismos eucariotas, anaerobios facultativos y heterótrofos. En condiciones anaerobias las levaduras fermentan azúcares produciendo etanol y CO₂ (McDonald y col., 1991), y otras especies degradan el ácido láctico en CO₂ y H₂O. La producción de etanol disminuye el azúcar disponible para producir ácido láctico, mientras que la degradación del ácido láctico eleva el valor del pH del ensilaje, lo cual a su vez permite el desarrollo de otros organismos indeseables (OudeElferink y col., 2001).

La supervivencia de las levaduras durante el almacenaje depende de la severidad de la anaerobiosis y la concentración de ácidos orgánicos. La presencia de oxígeno facilita la supervivencia y el desarrollo de las levaduras durante el almacenaje (Donald y col., 1995), mientras que un contenido elevado de ácido acético reducen su supervivencia (OudeElferink y col., 1999).

Las poblaciones de levaduras pueden alcanzar hasta 10⁷ UFC/g durante las primeras semanas del proceso de ensilaje; un período prolongado de almacenaje reduce gradualmente la presencia de levaduras (Jonsson y Pahlow, 1984). La actividad inicial de las levaduras parece ser incrementada en forrajes que generan niveles bajos de pH (<5), por ejemplo, cuando se trata de materiales con un alto contenido de azúcares (papas, cáscaras de naranja o remolacha azucarera), o cuando

se emplean aditivos ácidos. Bajo estas condiciones el ensilaje resultante tiene concentraciones altas de etanol y bajas en ácido láctico (Henderson y col., 1972).

Los hongos son organismos eucariotas. Estos crecen en condiciones aerobias y a un pH de 3 a 8. Oxidan carbohidratos a CO₂ y H₂O. Proliferan en la superficie del ensilado, debido a la entrada de aire durante el período de almacenamiento o cuando se expone el ensilaje al aire por un periodo prolongado durante la alimentación. Su presencia en un ensilaje es fácil de identificar debido a los filamentos de diversos colores y de gran tamaño que producen muchas de sus especies. Durante la fase IV o de deterioro aeróbico del proceso del ensilaje, todo el contenido puede ser invadido por hongos (Mc Donald y col., 1991).

Los mohos disminuyen el valor nutritivo y la palatabilidad del ensilaje, y producen potentes toxinas, por estas razones son indeseables en los silos. Las esporas de mohos pueden asociarse a ciertas afecciones pulmonares y reacciones alérgicas (OudeElferink y col., 2001). Otro problema de salud asociado con hongos, son las micotoxinas. Éstas son metabolitos secundarios producidos por hongos encontrados en una gran variedad de productos agrícolas (plantas, henos, silos, granos, subproductos y otros). Son los contaminantes naturales de alimentos más extendidos a nivel mundial. Altamente tóxicos, mutagénicos, cancerígenos, teratogénicos e inmunosupresores. Debido a su gran variedad de efectos tóxicos y a su termorresistencia, la presencia de micotoxinas en alimentos es considerada de alto riesgo para la salud humana y animal (Méndez y Moreno, 2009).

Dentro de los principales géneros de hongos de interés pecuario se destacan fundamentalmente: los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Osweiler, 2000). Los hongos de almacenamiento más importantes corresponden a especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, en cambio las especies de *Fusarium* invaden las plantas fundamentalmente en el campo (D'Mello y col., 1999).

Entre las micotoxinas, las aflatoxinas, son producidas por los hongos del género *Aspergillus* sp. (*A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*). Se conocen varias aflatoxinas, destacándose B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂. Entre las principales micotoxinas producidas por el género *Fusarium* los Tricotecenos: Deoxynivalenol (DON), nivalenol, Toxina T-2 y Diacetoxyscirpenol (DAS); la Zearalenona y las Fumonisinias (FB₁, FB₂, FB₃) (Méndez y Moreno, 2009).

Para reducir el desarrollo de hongos, las técnicas de ensilaje deben de minimizar el ingreso de aire bajo una excelente compactación y cierre hermético de la reserva. Se pueden utilizar además aditivos que inhiben el deterioro aeróbico y así poder prevenir o limitar el desarrollo de estos contaminantes (OudeElferink y col., 2001).

Efecto del pH del ensilaje

Cuando el pH de un ensilaje es superior a 5 pueden actuar bacterias indeseables que fermentan los carbohidratos y ácidos orgánicos produciendo ácido butírico, dióxido de carbono e hidrógeno, con cambios en el color y olor del silo. Incluso, otros microorganismos proteolíticos fermentan a los aminoácidos y generan, especialmente, amonio (olor a amoníaco o a orina) y aminas (olor a pútrido). Estas últimas son potencialmente reductoras del consumo voluntario de los animales (Bergen y col., 1974).

Las bacterias coliformes actúan particularmente cuando el forraje posee un elevado porcentaje de humedad, alto contenido de proteínas (leguminosas) o bajo nivel de azúcares. Las fermentaciones generadas por estos microorganismos producen una disminución tanto de la MS del ensilaje como de la energía del mismo (Muck, 1988). Sin embargo, la acción de estos microorganismos se ve inhibido cuando el pH es inferior a 4.5, por ello, en la medida que éste descienda rápidamente se reducen las pérdidas causadas por estos agentes (Fernández, 1999).

Estabilidad aeróbica de ensilajes

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 y col., 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 y col., 2004).

Es la acción de estos microorganismos que 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 y col., 2001). El deterioro aeróbico del ensilado puede afectar la salud animal, y por tanto afectar la rentabilidad de la unidad de producción (Kristensen y col., 2010).

Al tratarse de un proceso biológico en el que se genera calor, se produce un aumento de la temperatura en la masa ensilada que conlleva serias pérdidas de MS y gran disminución de la digestibilidad de la proteína, unido a elevados valores de pH, muestra de la inestabilidad alcanzada (de la Roza, 2005). Las pérdidas en MS en ensilados expuestos al aire durante diez días pueden superar el 30 %, el pH puede llegar a alcanzar un valor de 9 y la digestibilidad de la proteína disminuye al incrementarse la temperatura de la masa ensilada incluso por encima de los 60°C (Martínez y col., 2001).

Aditivos para ensilaje

A partir de la década del '90, el uso de aditivos para favorecer las condiciones de almacenaje o reducir procesos de deterioro durante el suministro de ensilajes, comenzaron a hacerse más comunes (OudeElferink, y col., 2001). Estos productos y/o sustancias estimulan la fermentación láctica aumentando el sustrato fermentescible o creando condiciones adecuadas (bajo pH) para lograr una rápida estabilización y por ende, menores pérdidas. Otros en cambio, actúan inhibiendo las fermentaciones secundarias que dañarán la calidad final del ensilaje (Fernández, 1999).

Un problema práctico que presentan algunos aditivos es su naturaleza corrosiva que puede dañar equipos y constituir un riesgo para su manipulación. Los aditivos biológicos no son corrosivos y no hay peligro en su manipulación (Gaggiotti y col., 2001; OudeElferink, y col., 2001; Romero y col., 1996).

Los aditivos se pueden dividir en cinco (5) categorías, (McDonald y col., 1991)

- I. Los estimulantes de la fermentación: bacterias ácido lácticas (BAL), azúcares (melaza) y enzimas.
- II. Inhibidores de la fermentación: ácido fórmico y ácido láctico (o su sal correspondiente), ácidos minerales, nitritos, sulfitos y cloruro de sodio.
- III. Inhibidores de deterioro aeróbico: bacterias ácido lácticas (BAL), ácidos propiónico, benzoico y sórbico (o su sal correspondiente).
- IV. Nutrientes: urea, amoníaco y minerales.
- V. Absorbentes: pulpa seca de remolacha azucarera y paja.

Estimulantes de la fermentación

Inoculantes Microbianos

La idea de agregar al material que entra al silo un cultivo bacteriano de cepas seleccionadas para promover una fermentación deseable, existe desde principios de siglo XX (McDonald y col; 1991). Sin embargo, el uso de inoculantes biológicos para ensilados se ha convertido una práctica común en las últimas décadas. Estos aditivos bacterianos contienen cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) que ayudan a una rápida y eficiente fermentación de los materiales ensilados (Contreras-Govea y Muck, 2006). Los microorganismos seleccionados, generan naturalmente una rápida acidificación, al disminuir el pH, lo que permite la estabilización del forraje y evita la proliferación de hongos y levaduras. Además, permite una conservación más prolongada en el tiempo y un mejor aprovechamiento del ensilado por los animales (McDonald y col., 1991).

El inoculante puede contener una o más cepas de BAL. Éstas, pueden ser homofermentativas o heterofermentativas, dependiendo de cómo fermentan los azúcares de la planta. Ambos tipos de BAL mejoran la calidad del ensilaje, aunque tienen diferentes funciones y actúan en distintas fases del proceso de ensilaje (Queiroz, 2014).

Las bacterias homofermentativas como *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Pediococcus spp.*, y *Enterococcus spp.*, producen principalmente ácido láctico (Contreras- Govea y col., 2009). Éstas, al reducir rápidamente el pH, minimizan las pérdidas de MS, disminuyendo la proteólisis y la formación de amonio. Además, aumentan el ácido láctico y la digestibilidad de la MS. Una reducción rápida en el pH también puede inhibir bacterias que producen ácido butírico, producto de una mala fermentación que produce un mal olor (Muck y Kung, 1997). El control en la fermentación secundaria puede ocasionar un aumento en la recuperación de MS al final de la fermentación (Kung, 2003). De esta manera, el principal beneficio del uso de bacterias homofermentativas es reducir las pérdidas de energía, nutrientes y MS asociadas con la fermentación secundaria (Huisden y col., 2009).

Las bacterias heterofermentativas como *L. buchneri* producen ácido láctico, ácido acético, etanol y bióxido de carbono (Muck, 2008). El ácido láctico baja el pH más rápido, en consecuencia disminuye la actividad enzimática, inhibiendo otras bacterias. El ácido acético producido por las bacterias heterolácticas puede también reducir la fermentación de etanol producida por las levaduras, inhibiendo el crecimiento fúngico en forrajes con alta concentración de azúcares (Queiroz, 2014), y mantiene una mayor estabilidad aeróbica que el ácido láctico (Contreras- Govea y col., 2009).

El principal propósito de los inoculantes heterofermentativos es mejorar la estabilidad aeróbica a través de reducir el nivel de levaduras en el ensilaje (un alto nivel de levaduras puede causar calentamiento). La principal BAL heterofermentativa usada es *Lactobacillus buchneri*. Un problema con *L. buchneri* es que crece más lento que otras bacterias en el ensilaje, por tanto, las bacterias naturales homofermentativas promoverán la fermentación inicial, y más tarde *L. buchneri* convertirá el ácido láctico a ácido acético (Muck, 2008).

La combinación de ambos tipo de BAL presenta como ventaja potencial tener una rápida reducción inicial en el pH controlada por las bacterias homofermentativas y más tarde una buena estabilidad aeróbica que es controlada por bacterias heterofermentativas produciendo más ácido acético (Contreras- Govea y col., 2009).

Estos aditivos presentan algunas ventajas sobre los otros tipos de aditivos, seguridad en su manejo, baja tasa de aplicación por tonelada de forraje y no contaminan el medio ambiente. La presentación de los inoculantes en el mercado es en estado polvo para diluir en agua, se aplica durante el proceso de ensilaje mediante un mixer respetando las instrucciones del fabricante, para asegurar un mezclado perfecto y permitir un rápido inicio de la fermentación (Contreras-Govea y Muck, 2006).

Enzimas

Las enzimas son una nueva clase de aditivos para silos. Reducen el contenido de fibra por degradación de las paredes celulares (Yang, 1999). La mayoría de las enzimas usadas en aditivos son subproductos o extracto fermentativo microbiano (*Bacillus* spp) o fúngico (*Trichoderma* spp y *Aspergillus* spp) que tiene uno o más tipos de actividad enzimática (Rode y col., 1999).

Existen varios tipos de enzimas disponibles para ser utilizadas como aditivos en silos, la hemicelulasa, que degrada la hemicelulosa en pentosas, dejando disponible azúcares para ser utilizados en el proceso de fermentación, y además siendo consideradas responsables por la reducción del contenido de la fibra neutro detergente (FDN), la celulasa, enzima que degrada la celulosa en glucosa, y responsables por la reducción del contenido de fibra neutro detergente (FDN) y fibra ácido detergente (FDA). La amilasa, que degrada el almidón y la pectinasa que degradan las pectinas (Pitt, 1990). Comúnmente las enzimas se utilizan en combinación con los microorganismos lacto génicos. La adición de preparaciones de enzimas, solas o en combinación con inoculantes, se propone como una estrategia para aumentar el sustrato disponible y mejorar la fermentación láctica del ensilaje (Yang, 1999).

Azúcares (melaza)

La melaza ha sido utilizada como estimulante de fermentación desde hace años y recientemente ha habido un renovado interés en su uso. Es un subproducto de las industrias de la caña de azúcar y azúcar de remolacha. Contiene 79% de carbohidratos solubles, siendo la sacarosa el componente principal. Proporciona una fuente relativamente barata de hidrato de carbono fermentecible para las BAL y se ha aplicado a razón de 18-36 kg/tonelada de forraje fresco. Numerosos experimentos con ensilajes han demostrado que la melaza es un eficaz aditivo en términos de promoción de la fermentación láctica, reducción de pH del ensilaje, desalentando la fermentación clostridial y proteólisis, y disminuyendo en general las pérdidas de materia orgánica. Es especialmente beneficioso cuando se aplica a los cultivos forrajeros con bajo contenido de carbohidratos fermentecibles para las BAL (Kung, 1999).

Sin embargo, el hecho de suplir azúcar no es suficiente para permitir que las BAL puedan competir exitosamente con otros componentes de la microbiota del ensilaje y asegurar una buena preservación. Incluso, bajo condiciones de alta humedad, la melaza puede también inducir un deterioro clostridial (Woolford, 1984).

Su aplicación directa es difícil debido a su alta viscosidad, por lo que se recomienda diluirla, preferiblemente con un pequeño volumen de agua tibia para minimizar las pérdidas por escurrimiento. En forrajes de cultivos con muy bajo contenido de MS, una parte considerable del aditivo puede perderse en el efluente del silo en los primeros días del ensilaje (Henderson, 1993).

Inhibidores de la fermentación

Este tipo de aditivos podría utilizarse en todo tipo de ensilaje, pero en la práctica se utilizan solamente en cultivos con bajo contenido de carbohidratos hidrosolubles y/o alta capacidad tampón, como las leguminosas. En algunos países los inhibidores más difundidos son las sales, por su facilidad de manejo y seguridad de manipulación frente a los ácidos (McDonald y col., 1991; OudeElferink y col 2001).

Los ácidos inorgánicos utilizados incluyen ácido sulfúrico, clorhídrico y fosfórico. Se pueden añadir al ensilaje individualmente o como mezcla. Ensilajes tratados con ácido sulfúrico, tienen un pH bajo, con reducción de la proteólisis, reducción de la concentración de ácido láctico, acético y butírico, y mayor concentración de carbohidratos en comparación con el ensilaje no tratado. No tienen propiedades antimicrobianas específicas, simplemente actúan como agentes acidificantes (Drysdale, 1987).

El ácido fórmico (85%) posee efecto bactericida en determinado valor de pH, reduce niveles de ácidos orgánicos, así como el pH del ensilaje a través del aumento de la concentración de iones de hidrogeno del medio. Se ha utilizado en dosis de 5 a 6 L/tonelada de MV, diluido con agua. Para que su acción sea eficaz, necesita ser rociado sobre el forraje picado. La formalina (solución 35-40 % de formaldehido) se ha empleado para disminuir la degradación proteica en el silo. El formaldehido restringe considerablemente la fermentación del ensilaje (Boin, 1975). Este tipo de aditivos pueden inhibir el desarrollo de clostridios y de sus formas de resistencia, las esporas en ensilajes (OudeElferink y col., 2001).

La sal común (cloruro de sodio) no debe ser empleada, debido a que causa un efecto contrario sobre la acidificación del material, al ejercer un efecto amortiguador al descenso del pH. En esas condiciones, se desarrollan fermentaciones indeseables que pueden perjudicar la calidad del ensilaje (Fernández, 1999).

Inhibidores de deterioro aeróbico

La adición de ácidos orgánicos acidifica rápidamente forrajes inhibiendo así el crecimiento de Clostridios y enterobacterias que aumentan las pérdidas de MS y la degradación de proteínas durante el ensilaje. Ejemplos de tales ácidos incluyen propiónico, benzoico, sórbico y ácido fórmico. El ácido propiónico y sus mezclas con otros ácidos como el acético son usados para reducir las pérdidas por fermentaciones secundarias durante la apertura del silo y para mejorar la vida del mismo. Inhibe el desarrollo de hongos y levaduras (Ramírez, 1999).

Cuando se añade 1 a 2% del peso fresco, el ácido propiónico limita las pérdidas de MS, pero es corrosivo. La sal del ácido propiónico, propionato de amonio, es menos corrosiva y cuando se aplica a concentraciones de 0,1 a 0,2% no puede afectar la fermentación, pero puede mejorar la estabilidad aeróbica (Kung, 2000). Los ácidos sórbico y benzoico también muestran gran actividad antimicrobiana (McDonald y col., 1991).

Nutrientes

Ciertos cultivos muestran deficiencias en algunos componentes nutritivos esenciales para una buena dieta de rumiantes. Al suplir los elementos deficitarios con un aditivo en el momento de ensilar se mejora el valor nutritivo del forraje. Los aditivos de nitrógeno no proteico empleados con este propósito incluyen amoníaco y urea (McDonald y col., 1991). La urea agregada a forrajes con alto contenido de MS y bajo poder tampón (granos de maíz o sorgo) aumentan el contenido de proteína bruta y mejoran la estabilidad aeróbica al momento de la apertura del silo (Argamentería y col., 1997).

El agregado de urea en el orden del 2 a 4%, permite un aumento del pH al entorno de 8, ocurriendo una conservación en medio alcalino, por la liberación de amonio. Estos procesos disminuyen la concentración de toxinas; por lo tanto, la conservación con urea es una alternativa apropiada para determinados casos (Chalking y Brasesco, 1997; Gaggiotti y col., 2001).

El amonio sumado al elevado pH, mata las levaduras, hongos y bacterias responsables del calentamiento. Esto podría mejorar la vida del silo si éste permanece bien sellado hasta la apertura para su utilización. El método de aplicación debe asegurar una buena disolución y distribución, efecto que no siempre se logra cuando se la emplea (Ramírez, 1999).

Absorbentes

Los absorbentes son empleados para forrajes con bajo contenido en MS, para evitar pérdidas de nutrientes provocadas por escurrimiento excesivo del ensilaje (McDonald y col., 1991). Algunos productos utilizados son paja de cebada, bagazo de destilería desecado, pulpa de remolacha azucarera deshidratada, cebada laminada, paja de cereal, bentonita sódica y polímeros sintéticos. Un parámetro fundamental para garantizar el control de efluentes mediante su uso, es la dosis de aplicación. Ésta, dependerá del contenido de humedad de forraje a ensilar, de la capacidad de absorción del compuesto y del efecto del absorbente sobre la composición de los efluentes. Se pueden obtener reducciones significativas en la producción de efluentes con dosis de 1-2 kg/tonelada de forraje. La aplicación de 1 kg/tonelada de esta sustancia puede reducir en un 50% la producción de efluentes de forraje ensilado con un 20% de MS (Fernández, 2000).

HIPÓTESIS

- El agregado de un inoculante comercial homofermentativo a granos húmedos de sorgo almacenados en silos experimentales de laboratorio disminuye las pérdidas de materia seca.
- El recuento total de BAL se ve afectado positivamente con el agregado de un inoculante comercial homofermentativo a granos húmedos de sorgo almacenados en silos experimentales de laboratorio, comparado con el grupo control.
- Las poblaciones de levaduras, hongos totales y toxicogénicos, disminuyen con el agregado de un inoculante comercial homofermentativo a granos húmedos de sorgo almacenados en silos experimentales de laboratorio, comparado con el grupo control.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un inoculante comercial sobre materia seca, recuento de BAL, levaduras, hongos totales y toxicogénicos en granos húmedos de sorgo almacenados en silos experimentales de laboratorio durante 180 días.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar y comparar materia seca en granos húmedos de sorgo en silos experimentales de laboratorio con y sin inoculante comercial a los 180 días de almacenamiento.
- Determinar y comparar el recuento de BAL, levaduras y hongos totales de granos húmedos de sorgo en silos experimentales de laboratorio con y sin inoculante comercial a los 180 días de almacenamiento.
- Aislar e identificar hongos toxicogénicos de granos húmedos de sorgo en silos experimentales de laboratorio con y sin inoculante comercial a los 180 días de almacenamiento.
- Buscar las correlaciones entre pH, materia seca, levaduras, hongos totales y toxicogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Actividades de campo

Las muestras fueron obtenidas de un cultivo de sorgo variedad Summer T70, de un establecimiento del Departamento de Canelones, al momento del ensilaje. Los granos de sorgo ensilados húmedos fueron destinados al consumo de ganado lechero perteneciente a un grupo de productores de la zona. La fecha de siembra del sorgo fue 14 y 15 de noviembre de 2011 y fue cosechado el 12 de abril del 2012. Al momento de la cosecha, los granos de sorgo presentaron una humedad de campo en un rango entre 27-32%. Los tenores de taninos condensados (TC) de la variedad del estudio, fueron categorizados como de intermedios, según INASE-INIA. En el cuadro 1, se presentan las características del sorgo utilizado en el experimento. Se colectaron aproximadamente 85 kg de granos quebrados, que fueron almacenados en bolsas plásticas, herméticamente cerradas, para ser trasladadas al laboratorio de Toxicología, en donde se realizó la elaboración de los silos experimentales.

Cuadro 1. Características principales de la variedad del sorgo utilizado en el experimento.

Variedad Summer T70	Características
Ciclo	Largo
Días a floración	68-75
Color de grano	Marrón
Taninos condensados	Presentes
Color de la planta	Roja
Altura de planta	1,50-1,70
Macollaje	Medio
Tamaño del grano	Medio

Análisis químicos

Sobre las muestras iniciales se determinó el contenido de MS, cenizas (CEN), proteína bruta (PB) según A.O.A.C. (1984). Las fracciones fibra neutro (FND) y ácido detergente (FAD) se determinaron de acuerdo con Goering y Van Soest (1970). La determinación de taninos condensados se realizó por el método Butanol-HCl de acuerdo a Makkar (2000).

Cuadro 2. Composición química de los granos de sorgo del experimento evaluados previamente al ensilaje.

Días ensilaje	MS	CEN	PB	FND	FAD	pH	TC
0	72.74	2.28	7.20	14.94	9.39	6.26	0.55

MS: % de materia seca de las muestras frescas; Cen: cenizas; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; TC: taninos condensados, expresados como porcentaje de la MS; * muestras con agregado de inoculante.

Diseño experimental

Se seleccionó un inoculante comercial conteniendo cepas homofermentativas de *Lactobacillus plantarum* DSM 16568 y DSM 4784 (Biomax® 5). Para su aplicación, se siguieron las recomendaciones del fabricante. Se diluyeron 5 mL del mismo en 2000 mL de agua destilada y de la solución obtenida se utilizó una dosis de inoculación de 60 mL para 30 Kg de la muestra de campo. Se elaboraron un total de 20 silos experimentales de laboratorio, utilizando envases herméticos de plástico de 3 kg de capacidad. De estos, 10 silos fueron confeccionados con material homogeneizado con el inoculante y los 10 restantes quedaron como controles. Se identificaron y almacenaron los silos en lugar seco a temperatura ambiente hasta su apertura a los 180 días, para los análisis posteriores.

Procedimientos y determinaciones en silos experimentales de laboratorio

Las determinaciones de pH, MS, recuento de hongos y levaduras, así como el aislamiento e identificación de hongos toxicogénicos se realizaron en el Laboratorio de Toxicología. La enumeración de BAL fue realizada en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Facultad de Veterinaria.

Evaluación de pH

A los días 0 y 180, se extrajeron alícuotas de 10 g de cada microsilo, se adicionaron 50 mL de agua destilada y se homogenizaron en un vaso de Bohemia para posterior lectura en pH metro (Oakton®).

Determinación de materia seca

Para evaluar MS se tomaron 10 g de cada muestra y se secaron en estufa (Elektro-Helios) a 105°C durante 24 horas. El cálculo se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula: % MS= 100 - % de humedad

Enumeración de BAL

La enumeración de BAL se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Kristensen y col. (2010). Se obtuvo un pool de 500 g de muestra a partir de alícuotas de 50 g de todos los microsilos y 10 g fueron homogenizados con 90 mL de agua peptonada bufferada estéril (Oxoid, UK) en *stomacher* (Bagmixer®400, Interscience) durante 5 minutos. Posteriormente se prepararon diluciones seriadas en agua peptonada bufferada estéril y se sembraron alícuotas de 0.1 mL de las diluciones -2 a

las -8 en cajas de Petri con Agar Man, Rogosa, and Sharpe (MRS, HiMedia®, India). Las placas se incubaron a 37°C en microaerofilia por 48 h. Las colonias fueron contadas en aquellas placas que tenían un mínimo de 30 y un máximo de 300 UFC. Cada análisis se efectuó por duplicado y se realizaron tres determinaciones en forma independiente.

Aislamiento e identificación de hongos y levaduras

Para el aislamiento e identificación de hongos y levaduras se extrajeron alícuotas (día 0 y 180) de 10 g de cada silo experimental. Luego 10 granos de sorgo de cada alícuota se sembraron en cajas de Petri conteniendo papa dextrosa agar (PDA: Agar 20 g; Dextrosa 20 g; Papas blancas 250 g; 1000 mL agua destilada). Se incubaron a 25 °C de temperatura, alternando ciclos de 12h/12h de luz y oscuridad durante 7-10 días. Las colonias se identificaron morfológicamente bajo microscopio óptico (40x). Los resultados se expresaron como frecuencia relativa de aislamiento de los géneros de hongos (porcentaje de muestras en las que cada género estaba presente) de acuerdo a lo reportado por Marasas y col. (1988).

Análisis estadísticos

Los datos de pH, MS, hongos totales, levaduras y *Penicillium* fueron comparados entre tratamientos (con y sin inoculante) por análisis de varianza ANOVA mediante PROC MIXED del SAS® de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_i = \mu + T_i + \varepsilon_i$$

Donde Y es la variable en estudio, μ es la media poblacional, T_i es el efecto fijo del tratamiento (i = con y sin inoculante) y ε_i es el error residual. Los datos del recuento de BAL se reportaron como media, \pm desvío estándar (DE). Se aplicó un análisis estadístico descriptivo de los mismos, tomando como variables explicativas el tiempo y el agregado de inoculante. Se realizó estadística de inferencia, mediante test de t para diferencias de medias independientes con varianzas distintas, previo test de Fisher (prueba de F). Se realizó ANOVA para la comparación de variables numéricas con 3 grupos (día 0, c/inoculante y s/inoculante). Se buscaron correlaciones para describir relaciones entre MS, pH, hongos, levaduras y *Penicillium* mediante el procedimiento Corr de SAS (SAS versión 9.0, SAS Institute, Cary, NC, USA). Se consideraron diferencias significativas cuando $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

En el cuadro 3 se presentan los valores de las medias, DE y nivel de significancia del tratamiento con y sin inoculante sobre pH, MS, hongos totales, levaduras y *Penicillium* de los granos de sorgo a los 180 días del ensilaje en los silos experimentales. Como se puede observar, el agregado de inoculante no afectó los valores de pH ($P=0.109$), pero si afectó MS ($P=0.003$). La media del valor de pH en este trabajo para el tratamiento con inoculante fue 4,95 y para el tratamiento control 5,04. El porcentaje de MS fue menor en los silos tratados con inoculante (72.05) en relación a los controles (69.34). Tanto las poblaciones totales de hongos, levaduras y *Penicillium* no se vieron afectadas por el agregado del inoculante ($P>0.05$).

Cuadro 3. Efecto del inoculante sobre pH, MS, hongos totales, levaduras y *Penicillium* en granos de sorgo de silos experimentales.

Parámetro	CI		SI		P
	Media	DE	Media	DE	
pH	4.95	0.18	5.04	0.26	0.109
MS	72.05	0.68	69.34	2.4	0.003
Hon*	11.20	3.12	10.00	2.54	0.358
Lev*	10.00	0	9.10	1.66	0.104
Pen*	1.20	3.12	0.80	1.32	0.713

CI: con inoculante; SI: sin inoculante; MS: materia seca; Hon: hongos totales; Lev: levaduras; Pen: *Penicillium*; *: Log N° de aislamientos; DE: desvío estándar; P: nivel de significancia del efecto del tratamiento

En el cuadro 4 se presentan media y desvío estándar de los valores de BAL expresados en Log UFC/g de silos con inoculante y sin inoculante al día 0 y a los 180 días de almacenamiento. Se observó diferencia significativa entre los silos tratados con inoculante y los no tratados ($P=0.04$).

Cuadro 4. Valores de BAL expresados en Log UFC/g de silos con inoculante y sin inoculante

Tratamiento	Recuento BAL (Log UFC/g)*
C/Inoculante	7.39 ± 0.27 ^{a-A}
S/Inoculante	6.71 ± 0.29 ^{b-A}

*Valores de la media ± desvió estándar

** Letra minúsculas diferentes entre los tratamientos indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

***Letras mayúsculas diferentes entre tiempos en un mismo tratamiento indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

El 100% de los silos experimentales presentaron contaminación por hongos y levaduras. El único género toxicogénico identificado fue *Penicillium*, encontrándose aislamientos de este género en el 35% de los silos. Comparando el grupo con inoculante sobre el control, se encontró una frecuencia relativa del 30% en el primero y de un 40% en el segundo grupo.

En el cuadro 5 se pueden observar las correlaciones entre MS, pH, poblaciones de hongos, levaduras y *Penicillium*. La MS y el pH se correlacionaron negativamente ($r = -0.520$; $P = 0.019$). Las levaduras también se correlacionaron negativamente con pH ($r = -0.542$; $P = 0.014$) y positivamente con las poblaciones de hongos ($r = 0.577$; $P = 0.008$). En cuanto al género *Penicillium*, se correlacionó negativamente con los hongos ($r = -0.452$; $P = 0.026$), presentando alta correlación positiva con las levaduras ($r = 0.896$; $P = <.0001$).

Cuadro 5. Correlaciones entre materia seca, pH, poblaciones de hongos, levaduras y *Penicillium* de silos experimentales de grano húmedo de sorgo con y sin inoculante.

Variable	PE	MS	pH	Hongos	Levaduras
pH	r	-0.520			
	P	0.019			
Hongos	r	0.198	-0.286		
	P	0.402	0.221		
Levaduras	r	0.141	-0.542	0.577	
	P	0.553	0.014	0.008	
<i>Penicillium</i>	r	0.145	-0.076	-0.452	0.896
	P	0.542	0.749	0.026	<.0001

PE: parámetro estadístico; MS: materia seca.

DISCUSIÓN

El descenso del pH por sí solo no es considerado como único criterio seguro para la evaluación de los ensilajes, porque su efecto inhibitor sobre bacterias y enzimas de las plantas depende de la velocidad de disminución en la concentración iónica y del grado de humedad del medio (Vieira y col., 2004). Sin embargo, el descenso del pH es fundamental para obtener una adecuada conservación del material ensilado. El pH inicial de los granos del experimento fue elevado (6,26) y durante el ensilaje, éste disminuyó. Sin embargo, tanto en los silos tratados como en los controles los valores fueron superiores a los recomendados. Según Chalkling y Brasesco, (2003), el pH final óptimo del silo de sorgo húmedo se encuentra entre 4 y 4.5. Filya (2003) en microsilos de sorgo en jarras de vidrio almacenados durante 60 días a temperatura ambiente y utilizando *L. plantarum* como inoculante homofermentativo, *L. buchneri* como heterofermentativo y una mezcla de ambos, reportó un pH inicial de 5,9, valor inferior al del inicio de este experimento.

En cuanto al agregado de inoculante, no afectó al pH como era esperable, pues no se vieron diferencias significativas en los silos con inoculante y los silos controles. Es así que, Ely y col., (1981) indican valores de pH de 5,40 para silos de sorgo inoculados con *L. plantarum* almacenados en tambores de acero a temperatura ambiente y fermentados durante 33 días. En este trabajo, los autores reportaron valores de pH similares a los nuestros y tampoco encontraron diferencias significativas en los valores de pH de los tratamientos al finalizar el mismo. Resultados similares son reportados por Hugo (2011) en microsilos de granos húmedos de sorgo fermentados en recipientes plásticos con y sin agregado de inoculante, almacenados a temperatura ambiente y fermentados durante 180 días, no observó diferencias significativas entre ellos.

En relación al agregado del inoculante en el ensilaje, éste disminuyó el porcentaje de MS en los silos tratados, encontrándose valores de MS similares con respecto al día 0. Debemos considerar que, en los silos de nuestro experimento, no hubo efluentes, pero si hubo pérdida de MS en los silos sin inoculante. También es posible que sustancias volátiles como el etanol y NH_4 se pierdan en los ensilajes. En este sentido, Zago (1991) relata que las modificaciones en el proceso fermentativo del sorgo podrían reducir el contenido de MS, debido a la producción de "agua de metabolismo" y por consiguiente aumentar el porcentaje de FND y disminuir la digestibilidad de la MS.

Otros trabajos como el de Grise y col., (2006), utilizando silos experimentales de PVC con capacidad de 18 L, con agregado de inoculante comercial con bacterias y enzimas, aplicado a diferentes dosis y fermentados durante 60 días, obtuvieron como resultado un mayor contenido de MS en los tratamientos con inoculante en comparación con el grupo control también reporta en silos experimentales plásticos de 20 L, fermentados por 60 días e inoculados con inoculante heteroláctico (*L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*) y un inoculante homoláctico (*L. plantarum*, *P. acidilactici*), un mayor contenido de MS en aquellos que fueron tratados con inoculantes homolácticos en comparación con el grupo control y los inoculados con heterolácticos.

Con respecto al recuento de BAL en este trabajo, la concentración inicial del silo original se encuentra dentro de los valores esperables para silo de sorgo. Según Pahlow y col., (2003) las poblaciones nativas de BAL no son las mismas de un cultivo a otro, es así que en maíz y sorgo encontró recuentos de 7 Log UFC/g forraje fresco. En alfalfa, generalmente son más bajas (5 Log UFC/g forraje fresco) y más altas en pastos perennes (6 Log UFC/g forraje fresco). Además, los recuentos aumentan luego de cortado el forraje. En este sentido, Ely y col. (1981) reportan concentraciones de *Lactobacillus* spp. similares, en el entorno de 7 Log UFC/g en silos de sorgo. Por el contrario, otros autores como Guan y col. (2001) utilizando jarras de vidrio 1,5 L, como microsilos de sorgo, con dos inoculantes comerciales diferentes, con *L. plantarum* entre otros, indican concentraciones iniciales inferiores, de 4,48 Log UFC/g. Valores similares son reportados por Filya (2003), con recuentos totales de BAL de 4,48 y 4,6 Log UFC/g en el forraje fresco.

Las concentraciones de BAL a los 180 días, no presentaron diferencias significativas con respecto al tiempo 0 en un mismo tratamiento. En este sentido, Guan y col., (2001), a los 60 días de fermentación, reportan concentraciones de 4,37 y 5,58 Log UFC/g para cada tipo de inoculante. Adicionalmente, estos autores indican que los valores máximos de BAL, se encontraron en los primeros días del proceso de ensilaje, entre los 2 y 4 días de fermentación, con valores de 9,14 y 9,27 Log UFC/g respectivamente. En este sentido, Xing y col., (2009) reportan en microsilos de bolsas plásticas de sorgo inoculados con *L. plantarum*, concentraciones de 5,61 Log UFC/g al inicio y a los 60 días del ensilaje valores de 6,70 Log UFC/g, similares a los de este experimento. Sin embargo, en nuestro trabajo no se evaluaron puntos intermedios para conocer la evolución de las BAL.

El tratamiento con inoculante presentó un recuento mayor luego de los 180 días de ensilaje con respecto al control. La concentración de BAL de los silos con inoculante se mantuvo en el periodo evaluado mientras que en el control disminuyó. Por el contrario, existen varios trabajos que reportan un aumento de la concentración de BAL al final del periodo de ensilaje en silos inoculados con BAL comerciales. Xing y col. (2009) en silos de sorgo con 60 días de ensilaje obtuvieron mayor concentración de BAL en el tratamiento con inoculante de 6.70 Log UFC/g, que en el tratamiento control que fueron de 5.32 Log UFC/g.

El 100% de los silos experimentales presentaron contaminación por hongos y levaduras. En otro experimento, donde se evaluaron silos de laboratorio de grano húmedo de sorgo también presentaron 100% de contaminación fúngica (Carmen García y Santos, comunicación personal, 2015). En este sentido Basilio y Orihuela (2012) estudiando la dinámica de los taninos condensados en cuatro genotipos de sorgo y su efecto en el tiempo y el desarrollo fúngico, en granos húmedos de sorgo en silos, observaron que el 100 % de las muestras resultaron contaminados por hongos.

En este sentido Ely y col., (1981) para comparar el efecto de un inoculante comercial, utilizaron diferentes tipos de forrajes adicionados con inoculante a base de *L. plantarum*. Estos observaron reducción en los recuentos de levaduras y mohos en ensilajes de alfalfa y trigo, pero no tuvieron efecto significativo en los ensilajes de sorgo o maíz. También Filya (2003), encontró en silos inoculados con *L. plantarum*, mayor población de levaduras y hongos con menor producción de ácido acético. A su vez la combinación de ambos tipos de BAL tuvo un efecto complementario, produciendo más ácido acético en los inoculantes heterofermentativos, resultando en una disminución de la población de levaduras y hongos, a diferencia de los homofermentativos.

En otro trabajo, Filya y Sucu (2007) en microsilos de sorgo de 1,5 L, inoculados *L. plantarum*, *L. buchneri* y una formulación líquida que con ácido fórmico, propiónico y benzoico, fermentados durante 90 días a temperatura ambiente, reportando que los microsilos inoculados con *L. plantarum* presentaron un menor pH (día 0 6.14, día 90 3.83), una mayor concentración de ácido láctico, con una población de levaduras mucho más elevada, en comparación con los demás inoculantes (día 0 4.23 log UFC/g, día 90 5.10 log UFC/g).

Las condiciones de crecimiento de los hongos a nivel de campo no es la misma en comparación con las etapas posteriores a la cosecha, donde se producen cambios de temperatura, humedad, actividad de agua (aw) y la humedad relativa. Los hongos crecen normalmente entre 10 y 40°C, a un intervalo de pH de 4-8 y en un nivel por encima de 0,70 aw. Dentro de los hongos de almacenamiento más importantes se destacan los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* spp. estos pueden crecer a aw inferior y a temperaturas más altas que *Fusarium* spp., que generalmente requieren una aw superior y un intervalo de temperatura inferior (Reyneri, 2006).

La actividad de los hongos comienza desde las primeras etapas del desarrollo de las plantas y continúa luego de la cosecha en los productos vegetales, dependiendo su evolución del manejo post cosecha y condiciones de almacenaje. Algunos de los hongos presentes en productos almacenados pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Gallardo y col., 1996). Los mohos se desarrollan en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno. En un buen ensilaje eso ocurre sólo al inicio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior de la masa ensilada, pero durante el deterioro aeróbico (Fase IV) todo el ensilaje puede ser invadido por mohos (Woolford, 1984).

En los silos de este experimento, el único género toxicogénico encontrado fue *Penicillium*. Este género se caracteriza por requerir menor humedad relativa ambiente entre 70-90%, rango de temperatura es más amplio entre 0-45°C y puede crecer a menor concentración de oxígeno y con valor de pH entre 5-7 (Christensen, 1987). En los silos estudiados por Basilio y Orihuela (2012), los géneros toxicogénicos más frecuentemente aislados fueron *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. A su vez, a medida que se acrecentaron los días de almacenamiento, el género *Penicillium* spp. aumentó su frecuencia a lo largo del tiempo, siendo el mayor contaminante a los 180 días.

En cuanto a las levaduras y el pH se correlacionaron negativamente, esto se pudo deber a la rápida producción de ácido láctico y bajo pH, favoreciendo la preservación de mayor cantidad de hidratos de carbono solubles, lo que generó un ambiente favorable para la supervivencia de levaduras. La actividad inicial de las levaduras parece ser incrementada en forrajes que generan niveles bajos de pH (<5), y con alto contenido de azúcares (Henderson y col., 1972), mientras que un contenido elevado de ácido acético reduce su supervivencia (OudeElferink y col., 1999). McDonald y col., (1991) y Filya y col., (2004) reportaron que los ácidos acético y propiónico son agentes fungicidas.

Las levaduras se correlacionaron positivamente con los hongos, en condiciones anaerobias, las levaduras degradan el ácido láctico produciendo fundamentalmente etanol el cual disminuye el azúcar disponible para producir ácido láctico, y como consecuencia de la degradación de este ácido aumenta el valor del pH del ensilaje (McDonald y col, 1991; OudeElferink y col., 2001) y de la temperatura, generando un ambiente adecuado para el crecimiento de mohos y otros microorganismos que deterioran el ensilaje (Honig y Woolford, 1980).

En este experimento, no se evaluaron puntos intermedios del ensilaje, por lo que se deberían hacer nuevos trabajos para ver el efecto del inoculante sobre la dinámica de pH, taninos condensados, hongos totales, levaduras y géneros toxicogénicos.

CONCLUSIONES

El agregado de inoculante en los silos de laboratorio de este experimento fue beneficioso ya que, disminuyó el porcentaje de MS y aumentó el recuento de BAL.

Las poblaciones de hongos totales, levaduras y toxicogénicos no se vieron afectadas por el inoculante utilizado en este experimento. El único género toxicogénico aislado fue *Penicillium* spp., encontrándose en menor frecuencia relativa en los silos tratados con inoculantes en relación a los controles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aarnikunnas, J., (2006). Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Tesis doctoral, Department of Basic Veterinary Sciences, Division of Microbiology and Epidemiology, University of Helsinki, Finlandia. 67p.
2. A.O.A.C. (1984). Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. 14a ed. Washington, AOAC,
3. Argamenteoría, G.A., de la Roza, B., Martínez, A., Sánchez, L., Martínez, A. (1997). El ensilado en Asturias. Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria, Asturias, CIATA, 127 p.
4. Barnes, F.R., Nelson, J.C., Collins, M., Kenneth, J.M. (2003). Forages: the science of grassland agriculture, 6a.ed. Iowa. Blackwell, V2, 556 p.
5. Basilio, D., Orihuela, J.J. (2012). Dinámica de los taninos condensados en cuatro genotipos de sorgo y su efecto en el tiempo y el desarrollo fúngico. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Uruguay. 48 p.
6. Benintende, S. y Hass, W., (2010) Ensilaje. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/academicas/deptos/catedras/microbiologia/unidad_19_%20ensilaje.pdf Fecha de consulta: 08/08/2014
7. Bergen, W.G., Cash, E.H., Henderson, H.E. (1974). Changes in nitrogenous compounds of the whole corn plant during ensiling and subsequent effects on dry matter intake by sheep. J Anim Sci; 39:629-635.
8. Boin, C. (1975). Elephant (Napier) grass silage production: effect of additives on chemical composition, nutritive value and animal performance. PhD Thesis, Cornell University. 215p.
9. Broberg A., Jacobsson K., Strom K. Schunurer J. (2007). Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. Appl Environ Microbiol. 73(17): 5547-5552
10. Carámbula, M. (2007). Verdeos de verano. Montevideo, Hemisferio Sur, 226p.
11. Carrasco, P. (1990). Sorgo granífero . Universidad de la República Oriental del Uruguay, Facultad de Agronomía, E.E.P., Paysandú. Cátedra de cereales y cultivos industriales. 156p.
12. Chakling, D., Brasesco, R. (1997). Ensilaje de grano húmedo: una alternativa promisoría. Montevideo. Plan Agropecuario-INIA, 47 p.
13. Chakling, D., Brasesco, R. (2003). Ensilaje de grano húmedo: una alternativa promisoría. Disponible en:

http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reserva_silos/28-ensilaje_grano_humedo.htm .Fecha de consulta: 21/06/11.

14. Chakling, D. J. (2004). Problemática del almacenaje de granos con humedades intermedias. Proyecto Línea de investigación Aplicada-Convenio: INIA– Soc. Rural de Río Negro (con Financiamiento BID). Young, Uruguay. 54p.
15. Christensen, C. M. (1987). Field and storage fungi. Beuchat LR, ed. Food and Beverage Mycology, Van Nostrand Reinhold, New York, 2:211-232.
16. Contreras-Govea, F., Muck, R. (2006). Microbial Inoculants for Silage. Focus on Forage 8 (4):1-4.
17. Contreras-Govea, E. F., Marsalis, A. M., Lauriault, M. L. (2009). Inoculantes microbiales para ensilaje: Su uso en condiciones de climacálido. Disponible en:[http://aces.nmsu.edu/pubs/_circulars/CR642 SPANISH.pdf](http://aces.nmsu.edu/pubs/_circulars/CR642_SPANISH.pdf) Fecha de consulta: 14/07/2014
18. Coria, L.M. (2008). Calidad de sorgos según tipos de corte y momento de cosecha. Disponible en: http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:urgZvWcmJ6oJ:www.produccionovina.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%2520artificiales/154-calidad_sorgo_segun_tipo_y_corte.pdf+tipos+de+sorgos+segun+inta+argentina+a%C3%B1o&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEESiad_xjVMAj1II9EsJnsLqskixf3uMWAUFWGrFTyaDseotx-2E_x54AAUTtvMTwHA9O0gA6u8LKawTUO_FAALoSo_Hsz8v7U87ppuKqdcwQinlneX_8TjryoelUQxVE81LnKkC9&sig=AHIEtbQZWDN_b1RLmqDFi0miUPfRXoMTA. Fecha de consulta: 21/06/14
19. Coutinho, H.S. (2009). Silagens de milho e sorgo tratadas com inoculante microbiano á base de bacterias homo e heteroláticas. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigencias do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae. Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 36 p.
20. Cussen, R., Neira, L. (1998). Inoculantes bacterianos como aditivos para ensilaje. Programa forrajes. Agrícola Nacional S.A.C é I.- ANASAC Disponible en: <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/seriesinia/NR23513.pdf>. Fecha de consulta: 15/06/2014
21. Danner, H., Holzer M., Mayrhuber, E., Braun, R. (2002). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. Applied Environ Microbiol; 69:562-567.
22. DIEA. (2015). Anuario estadístico agropecuario 2015. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/anuario_2015_-_diea.pdf Fecha de consulta: 03/08/16

23. D'Mello J.P.F., Placinta C. M., MacDonald A. M. C. (1999). Fusariummycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim Feed Sci and Technol.* 80:183-205.
24. de la Roza, B. (2005). El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. IV Jornadas de Alimentación Animal. Laboratorio de Mouriscade. Lalín, Pontevedra. 20 p.
25. Domanski, C., Giorda, L. M., Feresin, O. (1997). EEA.INTA.Manfredi, Arg., Cuaderno de Actualización N° 7, 47-50. Disponible en: <http://www.infogranjas.com.ar/animales/bovinos/5205-composicion-y-calidad-del-grano-de-sorgo>. Fecha de consulta: 29/07/2014
26. Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W. H., Van Wikselaar, P.G. (2001). Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forrage Science* 56: 330-343.
27. Drysdale, A. D. (1987). Acids and salts as products to improve silage preservation. En: J.M. Wilkinson B.A. Stark (ed.) *Developments in silage*. Chalcombe Publications, Marlow, UK, p.37-46.
28. Ely, L. O., Sudweeks, E. M. (1981). Inoculation with *Lactobacillus plantarum* of alfalfa, corn, sorghum and wheat silage. *J Dairy Sci*; 64:2378-2387.
29. Evers, A.D., Blakeney, A. B., Brien L. O. (1999). Cereal structure composition. *Aust. J. Agric. Res*; 50:629-650.
30. Fernández, M. A. (1999). El silaje y los procesos fermentativos. Silaje de planta entera, p. 4-11. EEA INTA Bordenave. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/01-el_silaje_y_los_procesos_fermentativos.pdf Fecha de consulta: 16/05/14
31. Filya, I., Sucu, E. (2007). The Effect of Bacterial Inoculants and a Chemical Preservative on the Fermentation and Aerobic Stability of Whole-crop Cereal Silages. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*; 20(3):378-384.
32. Filya, I., Sucu, E., Canbolat, O. (2004). Researches on Using Organic Acids in the Silage Fermentation. *Uludag Uni. Agric. Fak.*, 18(2):35-45.
33. Filya, I., (2003). The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *J Appl Microbiol*; 95:1080-1086.
34. Gaggiotti, M., Romero, L., Reinheimer, J., Calvinho, L., Wanzenried, R. (2001). Contaminación con esporos de clostridios gasógenos en forrajes conservados. 24 Congreso Argentino de Producción Animal, INTA Rafaela, Argentina. Disponible en:

http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/anuario2001/a2001_6.htm. Fecha de consulta: 26/08/2014

35. Gallardo, M., Guaita, M. S., Castillo, A. (1996). Estrategias y resultados de modelos de alta producción de leche en sistemas pastoriles. Temas de producción lechera. Argentina. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Publicación miscelánea no. 81. p. 101-112.
36. Gevehr, F. C., Riet-Correa, F. (2007). Botulismo. En: Riet-Correa, F., Schild, A. L., Lemos, R. A. A., Borges, J. R. J. Doenças de Ruminantes e Equinos. 3ª ed. Santa Maria. Pallotti, p. 215-224.
37. Gibson, J. (1965). Clostridia in silage. J Appl Bacteriol., 28:56-62.
38. Goering, H. K., Van Soest P. J. (1970). Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications), Agric. Handbook No. 379. Ars USDA, Washington, DC. Disponible en: <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT87209099/PDF>. Fecha de consulta:15/10/2015
39. Gomes de Araújo, P. R., Ramalho, T. C., Newton de Lucena, C., Avelar, M. J. (2008). Processos de ensilagem e plantas a ensilar. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Porto Velho, Rondônia. 18 p.
40. Grise, M. M., Martins, R. L., Fernandes, A. C., Rossi Junior, P., Piazzetta, R. G. (2006). Efeito do uso de inoculantes sobre o pH e a composição bromatológica da silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Arch. Vet. Sci., 11:13-16.
41. Guan Wu-tai., Ashbell, G. Hen, Y., Weinberg, Z. G. (2001). The effects of two inoculants applied to forage sorghum at ensiling on silage characteristics. Asian-Aust. J. Anim. Sci; 15(2)218-22.
42. Hammes, W. P., Weiss, N., Holzapfel, W. (1992). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. The prokaryotes. 320-403 pp. Disponible en: http://rd.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30744-3_10 Fecha de consulta: 01/09/14
43. Henderson, A. R., McDonald, P., Woolford, M.K. (1972). Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass treated with formic acid. J. Sci. Food. Agr., 23:1079-1087.
44. Henderson, N. (1993). Silage additives. Anim. Feed Sci. Technol; 45: 35-56.
45. Honig, H., Woolford, M. K. (1980). Changes in silage on exposure to air. En: Thomas, C. (ed.) Forage Conservation in the 80s. Occasional Symposium No. 11. British Grassland Society, Hurley, Berkshire, UK. p. 76-87.

46. Huchet, V., D. Thuault, Bourgeois, C. M. (1995). Modélisation des effets du pH, de l'acidelactique, du glycérol et du NaCl sur la croissance des cellules végétatives de *Clostridium tyrobutyricum* en milieu de culture. *Lait* 75:585-593.
47. Huisden, C. M., Adesogan, A. T., Kim, S. C., Ososanya, T. (2009). Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J Dairy Sci.* 92:690–697.
48. Hugo, P. I. (2011). Dinámica del pH de granos húmedos de sorgo ensilados en silo-bag y microsilos con distintos niveles de humedad. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Uruguay. 43 p.
49. Irigoyen, A., Perrachon, J. (2007). Sorgo granífero. *Revista Plan Agropecuario* 123:52-55.
50. Jonsson, A., Pahlow, G. (1984). Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. *Anim. Res. Develop.*, 20: 7-22.
51. Kleter, G., Lammers, W. L., Vos A. E. (1982). The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in whey and cheese 1. Experiments in whey. *Neth. Milk Dairy Journal*, 36: 79-87.
52. Knický, M. (2005). Possibilities to improve silage conservation. Effects of Crop, Ensiling Technology and Additives. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 34 p.
53. Kristensen, N.B., Sloth, K.H., Højberg, O., Spliid, N.H., Jensen, C., Thøgersen, R. (2010) Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *J D y S*; 93: 3764-3774.
54. Kumar A., Vaithyanathan, S. (1990). Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Anim. F S T*; 30: 21-38.
55. Kung, L., Stokes, M. R., Lin, C. J. (2003). Silage additives. En: Buxton, DR, Muck, RE, Harrison, JH. *Silage Science and Technology*. Madison, ASA-CSSA-SSSA, p.305-360.
56. Kung, Jr., (2000). Silage fermentation and additives. Professor, Department of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Newark, DE. *Direct-fed Microbial Enzyme & Forage Additive Compendium*, Miller Publishing Co., Minnetonka, MN. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efecto-inoculacion-lactobacillus.pdf> Fecha de consulta 22/11/2014
57. Kung Jr, L. (1999). A review on silage additives and enzymes. 16 p. Disponible en: <http://d2vsp3qmody48p.cloudfront.net/wp-content/uploads/2014/02/A-REVIEW-ON-SILAGE-ADDITIVES-AND-ENZYMES.pdf> Fecha de consulta: 22/11/2014

58. Lindgren, S., Petterson, K., Kaspersson, A., Jonsson, A., Lingvall, P. (1985). Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. *J. Sci. Food Agr.*, 36: 765-774.
59. Lus, J. (2009). Sorgos para silo y grano. ¿Sorgo o maíz para silo? Sileros clásicos, graníferos y doble propósito. ¿Cuál uso?. Disponible en: <http://www.gapp.com.ar/pdf/GAPPnews-Septiembre-2009.pdf> Fecha de consulta: 21/06/2014
60. Makkar, H. P. S. (2000). Evaluation and enhancement of feeding value of tanniniferous feeds. En: Brooker, J.D. (Ed.), *Tannins in Livestock and Human Nutrition: Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia*. ACIAR Proceedings No. 92, Canberra, p.52–56.
61. Marinissen J.; Melin A. A. (2009). Tipos de sorgo y valor nutritivo. En: *Sorgo en el sur. Calidad Nutricional*. Ediciones INTA, Argentina. 13 p.
62. Martínez, A., de la Roza, B., Modroño, S., Fernández, O., Afif, E. (2001). Maíz forrajero: Calidad de los ensilados elaborados con distintos aditivos comerciales. Estabilidad aeróbica de los mismos. *Actas del I Foro Iberoamericano de Pastos*. España, p. 379-385.
63. Marasas W. F. O, Jaskiewicz K, Venter FS, Van Schalkwyk DJ. (1988). Fusarium moniliforme contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *South African Medical Journal*, 74:110-114.
64. Mari S. (2003). Sorgo: Planificando la siembra. Disponible en: http://planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R107/R107_56.pdf 03/09/14 Fecha de consulta: 10/10/2014
65. McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S. J. E. (1991). *The Biochemistry of silage*. 2a ed. Marlowe, Chalcombe Publications. 340 p.
66. Méndez A. A; Moreno M. M. (2009). Las micotoxinas: Contaminantes naturales de los alimentos. Disponible en: <http://revistaciencia.amc.edu.mx/online/619-Albores%20Micotoxinas.pdf> Fecha de consulta: 24/11/2014
67. Merry, R. J., Lowes, K. F., Winters, A., (1997). Current and future approaches to biocontrol in silage. *Proc. 8th Int. Symposium Forage Conservation, Brno, Czech Republic*. p. 17-27
68. Muck, R. E. (2008). Improving alfalfa silage quality with inoculants and silo management. *Proceedings of the 70th Annual Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Syracuse, NY: Cornell University. p. 137–146.
69. Muck, R. E., and L. Kung, Jr. (1997). Effects of silage additives on ensiling. *Proceedings from the Silage: Field to Feedbunk North American Conference*. Ithaca, NY, p. 187-199.

70. Ojeda, F., Caceres, O., Esperance, M. (1990). Nutrición de rumiantes: Guía metodológica de investigación. San José. RISPAL-IICA, 344p.
71. Osweiler G. D. (2000). Mycotoxins: Contemporary Issues of Food Animal Health and Productivity. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 16(3): 511-530.
72. Oude Elferink, S. J. W. H., Driehuis, F., Gottschal, J. C. , Spoelstra, S. F. (2001). Estudio 2.0 - Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/X8486S/x8486s04.htm> . Fecha de consulta: 23/06/14
73. Oude Elferink, S., Driehuis, F., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. (1999). Silage fermentation processes and their manipulation. FAO, Electronic Conference on Tropical Silage Disponible en: <http://www.fao.org/doscrep/05/x8486e/8486e08.htm> Fecha de consulta: 01/09/14
74. Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J., Gill, D. R. (1997). The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. J. Anim. Sci. 75:868-879.
75. Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H., Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of ensiling. En: Buxton, D. R, Muck, R. E, Harrison, J. H. (Eds.), Silage Science and Technology. Madison, WI: American Society of Agronomy, p 31-93.
76. Pitt, R. E. (1990). Additives for silage and hay preservation. Ithaca, New York, Northeast Regional Agricultural Engineering Service. 53 p.
77. Pitt, R. E., Shaver, R. D. (1990). Processes in the preservation of hay and silage. En: Proceeding of Dairy Feeding Systems Symposium. Harrisburg, USA, 72 p.
78. Queiroz, C. M. O. (2014). Aditivos bacterianos para silajes. 5° Jornada nacional de forrajes conservados. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. INTA, Argentina, p. 133-138.
79. Ramírez, E. (1999). Aditivos en la confección de silaje. Sitio Argentino de Producción Animal. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/21-aditivos_en_la_confeccion_del_silaje.pdf Fecha de consulta: 16/05/14
80. Reed, J. D. (1995). Nutritional toxicology of tannins and related poliphenols in forage legumes. J. Anim. Sci; 73:1516-1528.
81. Reyneri, A. (2006). The role of climatic condition on micotoxin production in cereal. Vet. Res. Commun., 30 (Suppl. 1): 87–92.

82. Romero, L. A., Bruno, O. A., Giordano, J. M., Diaz, M. C. (1996). Silaje de granos con alta humedad. Temas de producción lechera. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela-INTA, Argentina. Publicación miscelánea no.81. p. 47-53.
83. Rovira, P., Velazco, J. (2012). Ensilaje de grano húmedo de sorgo: guía práctica para su uso en la alimentación de ganado de regiones ganaderas. Boletín de Divulgación N° 101, INIA. Montevideo. 20 p.
84. Rode, L. M., Yang, W. Z., Beauchemin, K. A. (1999). Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. Journal of Dairy Science 82:2121-2126
85. Ruskin, F. R. (1996). Lost crops of Africa: Grains. Washington: National Academis Press. Disponible en: <http://www.ebookdb.org/reading/5D7520G7714B202335177F69/Lost-Crops-Of-Africa--Grains> Fecha de consulta: 10/08/14
86. Sewell, H., Wheaton, H. N. (1999). Corn silage for beef cattle. Columbia, University of Missouri. Agricultural publication N° G2061). Disponible en: <http://www.muextension.missouri.edu/explore/agguides/ansci/g02061.htm> Fecha de consulta: 11/06/2013.
87. Scarpitta, N., (2008). ¿Qué necesitamos conocer sobre el silo de grano húmedo de sorgo? Revista Plan Agropecuario, 126:48- 54.
88. Schleifer, K. H., Ludwig, W. (1995). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. En: Wood, BJB, Holzapfel, WH (eds) The Genera of Lactic Acid Bacteria. London: Blackie Academic & Professional, p 7-18
89. Seckinger, H. L, Wolf, M. J. (1973). Sorghum protein ultrastructure as it relates to composition. Cereal chem; 50:455-465.
90. Siri, G. (2004). Sorgo., Facultad de Agronomía, Montevideo. 96 p.
91. Spoelstra, S. F.Courtin, M. G., van Beers, J. A. C. (1988). Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. J. Agr. Sci. (Camb.) 111:127-132.
92. Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol., 36:1-29.
93. Titterton, M. Bareeba, F. (2001). Ensilaje de gramíneas y leguminosas en los trópicos. En: Ed. t` Mannelje, L. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Roma, FAO. p. 43-52.
94. Vallati, A. (2011). Sorgo. Estación Experimental Agropecuaria INTA Bordenave. Disponible en:

http://inta.gob.ar/documentos/sorgo/at_multi_download/file/12.%20descripcion_sorgo.pdf

95. van Os, M., Dulphy, J. P. (1997). Role of ammonia and biogenic amines in intake of grass silage by ruminants. Disponible en: <http://edepot.wur.nl/210291> Fecha de consulta: 28/05/2015
96. Vieira, F. A.P., Borges, I., Stehling, C. A. V., Goncalves, L. C., Coelho, S. G., Ferreira, M. I. C., Rodrigues, J. A. S. (2004). Qualidade de silagens de sorgo com aditivos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 56 (6); 764- 772.
97. Veiga, A.C. (1986). Aspectos econômicos da cultura do sorgo. Infor. Agrop., 114:3-5.
98. Waniska, R.D. (2000). Structure phenolic compounds, and antifungal proteins of sorghum caryopses. Technical and Institutional Options for Sorghum Grain Mold Management: Proceeding of an international Consultation, 18-19 May 2000, ICRISAT, Patancheru, India. p. 72-106.
98. Woolford, M. K. (1984). The Silage Fermentation. Marcel Dekker, Inc., New York, 350p.
99. Xing, L., Chen, L. J., Han, L. J. (2009). The effect of an inoculant and enzymes on fermentation and nutritive value of sorghum straw silages. Bioresource Technology; 100:488-491.
100. Yang, W.Z., Beauchemin, K. A., Rode, L. M. (1999). Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. J Dairy Sci; 82:391-403.
101. Zago, C. P. (1991). Cultura de sorgo para produção de silagem de alto valor nutritivo. En: 4º Simpósio sobre nutrição de bovinos. Piracicaba, SP. Anais Piracicaba, Brasil, p.169- 217.
102. Zamora, M. (2007). Estadísticas sobre el cultivo de sorgo en la Argentina. En: Zamora, M.S., Melin, A. A., (Eds). Sorgo en el Sur. Buenos Aires: INTA. p. 5-6.