

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**



**Digestibilidad *in situ* de fermentos sólidos
con micelio de *Pleurotus ostreatus* en paja
de trigo adicionado con lactosuero ácido**

TESIS

Que para obtener el título de licenciatura en
Ingeniería Agroindustrial.

PRESENTA:

MELO SOTO BARUCH JAVIER

Director:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Tulancingo, Hgo., Enero 2009

ÍNDICE

	Pág.
INDICE DE CUADROS.....	I
INDICE DE FIGURAS	II
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA.....	III
RESUMEN	IV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Rumiantes	3
2.2 Microbiota ruminal	3
2.3 La digestión de los alimentos en el rumen (retículo-rumen) y la síntesis de los principios nutritivos para su utilización por el ganado vacuno	5
2.3.1 Absorción y utilización de los ácidos grasos volátiles (AGV).....	6
2.4 Importancia de los nutrientes para la secreción láctea.....	7
2.5 Digestibilidad.....	8
2.6 Alimentos para animales	11
2.7 Ensilado.....	13
2.7.1 Cambios químicos que se presentan durante la fermentación.....	13
2.7.2 El proceso del ensilaje.....	15
2.7.3 La microflora del ensilaje.....	19
2.7.4 El ensilaje como una alternativa para los desechos orgánicos	28
2.7.5 Efecto del procesado sobre la degradabilidad de la proteína en el rumen	32
2.7.6 Efecto del procesado sobre la apetencia y el consumo de pienso	33
2.8 Uso de aditivos en el ensilaje	33
2.8.1 Aditivos para inhibir la fermentación del ensilaje.....	38
2.8.2 Aditivos que inhiben el proceso de deterioro aeróbico	38
2.8.3 Aditivos usados como nutrientes o como absorbentes	39
2.8.4 Combinaciones de aditivos.....	40

2.8.5 Lactosuero como aditivo en el ensilaje.....	41
III. HIPÓTESIS	44
IV. OBJETIVOS.....	44
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Localización del Experimento.....	45
5.2 Diseño de los experimentos	45
5.3 Proceso quirúrgico para el estudio de la digestibilidad <i>in situ</i>	45
5.4 Elaboración de microsilos.....	46
5.5 Obtención de las Muestras para su Análisis.....	47
5.6 Variables de Estudio	
5.6.1 Extracciones.....	47
5.6.2 Determinación de pH.....	48
5.6.3 Determinación de humedad	48
5.6.4 Determinación de cenizas	49
5.6.5 Determinación de proteína cruda	49
5.6.6 Determinación de Fibra Detergente Neutro (FDN)	51
5.6.7 Digestibilidad <i>in situ</i>	52
5.6.8 Determinación de extracto etéreo	53
5.6.9 Extracto Libre de Nitrógeno (ELN)	53
5.6.10 Análisis estadístico de datos	54
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
VII. CONCLUSIONES	68
VIII. RECOMENDACIONES	69
IX. REFERENCIAS	70

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por cuidarme en todo momento y permitirme dar un paso en mi vida.

A mis padres, Alejandra Soto Paredes y Javier Nelson Melo Yáñez, a mis hermanos Lore, Esme, Perla, Martin, quienes me han apoyado en todo momento y todos mis proyectos de mi vida, MIL GRACIAS por ser quiénes son y como son. Y a ti que pronto te conoceremos, MIL GRACIAS que aun sin conocerte has llenado de luz la vida de toda nuestra FAMILIA.

A mi pequeña FAMILIA, mis GRANDES AMORES, Fanny y mi hijo, luces de mi vida e impulso máximo para seguir adelante, MIL GRACIAS x coincidir, compartir y convivir, solo tú puedes saber la magnitud de la FELICIDAD que habita en mí, GRACIAS a dios y a la vida por ponerlos en mi camino.

GRACIAS a tu FAMILIA, por abrirme siempre las puertas de casa, por apoyarnos siempre y permitirme compartir un poco de lo que soy.

A ti naya por contagiar a tu tía y a todos, esa alegría que te caracteriza y que inspira a seguir adelante sin importar nada.

A mis amigos y compañeros de clase por compartir clases y vivencias.

A los catedráticos que aportaron en mi, un poco del universo de conocimientos.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características químicas de un ensilado	18
Cuadro 2. Categorías de aditivos para el ensilaje	35
Cuadro 3. Composición media del suero lácteo	42
Cuadro 4. Concentraciones de lactosuero empleados como aditivo en los diferentes tratamientos	45
Cuadro 5. Comportamiento del pH durante el proceso de ensilaje	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bolsas de nylon que contienen muestra en estudio de digestibilidad <i>in situ</i>	10
Figura 2. Diagrama de técnica de digestibilidad <i>in situ</i>	11
Figura 3. Operación quirúrgica de fístula ruminal	46
Figura 4. Microsilos con 0, 12.5, 25, 50 y 100% de lactosuero, representados por los números 1,2 ,3 ,4 y 5 respectivamente	46
Figura 5. Determinación de materia seca en los tratamientos al inicio del proceso de ensilaje	55
Figura 6. Contenido de materia seca respecto al tiempo de ensilaje	56
Figura 7. Contenido de FDN al inicio del proceso de ensilaje	57
Figura 8. Determinación de FDN en los tratamientos a 0, 45 y 90 días	58
Figura 9. Análisis de proteína de los diferentes tratamientos al inicio del proceso de ensilaje	58
Figura 10. Contenido de proteína en a 0, 45 y 90 días de proceso de ensilaje ...	59
Figura 11, Contenido de ELN al inicio del proceso de ensilaje.....	60
Figura 12. Contenido de ELN durante el proceso de ensilaje.....	61
Figura 13. Contenido de cenizas en los tratamientos respecto al tiempo.....	62
Figura 14. Contenido de grasa en todos los tratamientos (0, 12.5, 25, 50 y 100) respecto al tiempo	63
Figura 15. Digestibilidad <i>in situ</i> de materia seca en silos al inicio del proceso de ensilaje	64
Figura 16. Digestibilidad de proteína cruda el inicio del proceso de ensilaje.....	65
Figura 17. Digestibilidad de proteína cruda durante el proceso de ensilaje	66
Figura 18. Digestibilidad de cenizas al inicio del proceso de ensilaje.....	66
Figura 19. Digestibilidad de cenizas durante el proceso de ensilaje	67

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

%	Porcentaje
μM	Micrómetro (Millonésima parte del metro)
g	Gramo
L	Litro
mL	Mililitro
pH	Potencial Hidrógeno
AGV	Ácidos grasos volátiles
MS	Materia Seca
ARC	Agricultural Research Council
CO_2	Bióxido de Carbono
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados
NNP	Nitrógeno no proteico
N	Nitrógeno
BAL	Bacterias ácido lácticas
C	Carbón
UFC	Unidades formadoras de Colonias
NO_2	Óxido de nitrógeno
NO	Monóxido de nitrógeno
H_2	Hidrógeno
Kg	kilogramo
cm	Centímetro
CF	Coefficiente de fermentación
MgSO_4	Sulfato de magnesio
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
MO	Materia Orgánica
NDF	Fibra Detergente Neutro
m^2	Metro cuadrado
h	hora
N	Normalidad
UV	ultra Violeta
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de Sodio

RESUMEN

Uno de los principales problemas que en México se presenta, es el incremento de desechos sólidos y líquidos orgánicos e inorgánicos, que se originan tanto en los núcleos domésticos (residuos urbanos) como en zonas agroindustriales y forestales.

Uno de los desechos sólidos, es la paja utilizada en el cultivo de hongos comestibles, como son las setas (*Pleurotus* spp.). Su producción ha estado realizándose de manera continua pero en escalas menores, por lo que se generan ciertas cantidades de desechos. Por otro lado, en la investigación que presento aquí se ha usado lactosuero proveniente de la elaboración de queso tipo Oaxaca, que puede ser usado como aditivo en distintas fermentaciones ya que su contenido de lactosa es alto. Si se considera que tanto la paja de desecho de los hongos comestibles como el lactosuero pueden ser utilizados en conjunto formando un ensilaje, es importante estudiar detalladamente esta relación, así como identificar las características físico-químicas (humedad, cenizas, grasa, fibra y proteína), relacionadas con la adaptación antes y después de la digestibilidad.

En este trabajo se establecieron 5 ensilajes de paja con micelio de *Pleurotus* spp. con diferentes concentraciones de lactosuero (0, 12.5, 25, 50 y 100%), los cuales fueron analizados en 0, 45 y 90 días. Con las distintas concentraciones de Lactosuero ajustando la humedad relativa del ensilaje a 70-75%. Se realizaron digestibilidades *in situ* por 48 horas., en una vaca Holstein, que contaba con fístula ruminal, los ensayos *in situ* se realizaron en bolsas de nylon con un tamaño de poro de 40µm, las cuales contenían ensilado seco.

Los resultados mostraron que existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en materia seca durante el proceso de ensilaje, con una digestibilidad de 36.23 - 37.39%. Además, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el contenido de fibra detergente neutro durante el proceso de ensilaje, sin registro digestibilidad. Los valores de proteína se situaron entre 5.13 – 5.74% al inicio del proceso de ensilaje con diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$), al igual que su digestibilidad.

El contenido de extracto libre de nitrógeno no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0.05$), así como en el contenido de cenizas. En cuanto a la digestibilidad de Cenizas mostró un comportamiento creciente, con valores entre 62.71 - 72.49% a los 90 días.

Los valores de pH al inicio del proceso de ensilaje se situó entre 6.37 – 6.88 sin indicios de bajar, sin embargo subió hasta valores de 8 a los 45 días, manteniéndose así hasta los 90 días.

Por lo anterior se puede concluir que el ensilado de paja de *Pleurotus ostreatus* adicionado con lactosuero ácido pueden generar condiciones indeseables para la obtención de ensilado de buena calidad, el cual no tiene aporte nutritivo para los rumiantes.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que México presenta, es el incremento de desechos sólidos y líquidos orgánicos e inorgánicos, que se originan tanto en los núcleos domésticos (residuos urbanos), como en zonas agroindustriales y forestales (Camacho *et al.*, 2003). De acuerdo con Falla-Cabrera 1995, sólo el 75% de la basura es colectada para depositarla en rellenos sanitarios y tiraderos, mientras el 25% restante no es colectada, vertiéndose a los arroyos y ríos sin ninguna consideración sanitaria previa. Entre los usos técnicamente factibles que se han destinado a este tipo de residuos, se encuentra la formulación de complementos alimenticios o como forrajes para animales.

Uno de los desechos sólidos, es la paja utilizada en el cultivo de hongos comestibles, como son las setas (*Pleurotus* spp.), su producción ha estado realizándose de manera continua pero en escalas menores, de tipo rural y muy rústicamente (Fernández, 2001), por lo que se generan ciertas cantidades de desechos. Por otro lado, el lactosuero proveniente de la elaboración de queso tipo Oaxaca, es muy probable que pueda ser usado como sustrato base en distintas fermentaciones ya que su contenido de lactosa es alto (Campos *et al.*, 2003). Si se considera que tanto la paja de desecho de los hongos comestibles como el lactosuero pueden ser utilizados en conjunto formando un ensilaje, es importante estudiar detalladamente esta relación, así como identificar las características físico-químicas relacionadas con la adaptación.

Una medida de degradación de proteína en el rumen, es la técnica de digestibilidad *in situ*, llamada así debido a que se realiza en el mismo sitio que produce la degradación de la proteína, la cual implica suspender en el rumen de animales fistulados una bolsa que contiene la materia prima.

La atracción del método *in situ* se basa en la facultad de comprobar fácilmente la degradación de la proteína. También permite usar animales alimentados con piensos comerciales normales, además facilita controlar un mayor número de materiales que utilizando los tradicionales métodos *in vivo*.

En esta tesis se estudió la digestibilidad *in situ* de ensilados de paja con micelio de *Pleurotus ostreatus*, utilizando como aditivo lactosuero ácido en distintas concentraciones.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Rumiantes

Los mamíferos que se clasifican como rumiantes tienen características de morfología y fisiología digestivas que los diferencian de los demás animales de granja. Los rumiantes tienen la extraordinaria capacidad para ingerir y utilizar forrajes como pastos, henos, pajas y ensilado para cubrir sus necesidades nutritivas, mediante la digestión microbiana y otros procesos vitales que tienen lugar en el retículo-rumen.

Las principales diferencias están en la porción anterior del tubo digestivo; A diferencia del hombre, cerdo, rata, perro y otros muchos animales cuyo estómago tiene un solo compartimiento, el ganado vacuno y los demás rumiantes poseen un estómago complejo con cuatro compartimentos. Estos cuatro compartimentos son el rumen o panza, retículo, omaso y abomaso o estómago verdadero (Miller, 1989).

2.2 Microbiota ruminal

Es precisamente la presencia de microorganismos en el rumen lo que confiere al animal sus características digestivas diferenciales con respecto a otros mamíferos domésticos, el alimento permanece en el rumen mientras que las bacterias y los protozoos celulolíticos desdoblan de los glúcidos estructurales o complejos (celulosa) obteniéndose el disacárido celobiosa y unidades de glucosa. Además se aprovecha el nitrógeno no proteico para su conversión en aminoácidos y proteínas microbianas, síntesis de la gran mayoría de las vitaminas hidrosolubles, producción y utilización de ácidos grasos de cadena corta como fuente de energía metabólica, así como neutralización de compuestos químicos detrimentales presentes en el alimento (Shimada, 2005).

Bacterias de rumen

La población de bacterias es variable entre 5,000 y 20,000 millones por gramo de contenido ruminal, las cuales muestran gran diversidad de géneros y especies, de un tamaño de cuatro micras en promedio, exclusivas del tubo digestivo, principalmente del retículo-rumen (las mismas especies están presentes en el intestino grueso, aunque en concentraciones de sólo de 10 a 1000 millones por g de digesta, y en proporciones diferentes), tienen especificidad según el huésped (las del líquido ruminal de bovinos no crecen bien en líquido de ovinos).

Al igual que las partículas del contenido ruminal, las que se adhieren a los alimentos se encuentran en forma estratificada, estas son digeridas en el conducto gastrointestinal y constituyen la principal fuente de proteína y vitaminas del animal. De acuerdo con el sustrato pueden ser Gramnegativas (como las que fermentan forrajes) o Grampositivas (principalmente las que desdoblan granos como los lactobacilos). Todas son anaeróbicas facultativas. Las bacterias se seleccionan con base a una capacidad de adaptación a los cambios ecológicos ruminales y a su capacidad de trabajo bioquímico, las que sobreviven sólo aquellas especies que pueden adaptarse más rápidamente y crecer al máximo en un medio dado. De los sistemas de clasificación bacteriana existentes, probablemente los más aceptados son los que se basan en el tipo de sustrato sobre el que actúan las bacterias. De este modo, se dividen en celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus*), hemicelulolíticas, amilolíticas, sacarilíticas, utilizadoras de ácidos, proteolíticas, lipolíticas, hidrogenantes, metanogénicas, entre otras, que tienen dualidad de funciones (Shimada, 2005). Si un rumiante pasa de celulosa a una alimentación rica en almidón (cereales por ejemplo), se desarrollan bacterias digestoras de almidón (*Ruminobacter amylophilus* o *Succinomonas amyloyitica*)(Madigan, T. *et al.*, 2004).

También existen protozoarios que tienen características funcionales comunes, así como levaduras y hongos (como *Neocalimastix*), los cuales son anaerobios, que alternan una forma flagelada y otra filamentosa, su número es similar y por tanto sus funciones igual de trascendentes (Madigan, T. *et al.*, 2004).

2.3 La digestión de los alimentos en el rumen (retículo-rumen) y la síntesis de los principios nutritivos para su utilización por el ganado vacuno

El ganado vacuno produce cantidades enormes de saliva (alrededor de 115 L / día) que lubrica el alimento y facilita la deglución. En la saliva se encuentran abundantes cantidades de compuestos tampón, especialmente bicarbonatos y fosfatos, que son factores clave para el mantenimiento de pH del rumen dentro del intervalo adecuado, entre 6.5 y 7.2, para el funcionamiento eficaz de los microorganismos. Al mismo tiempo, proporciona diversos nutrientes necesarios para los microorganismos (Church y Pond, 1998).

Una de las más notables e importantes relaciones simbióticas de la naturaleza, es la existente entre los animales rumiantes y los microorganismos de su retículo-rumen, los cuales llevan a cabo una serie numerosa de descomposiciones, transformaciones y reacciones sintéticas, para lograr la síntesis de nutrientes esenciales, como las vitaminas del grupo B, vitamina K y los aminoácidos esenciales y la utilización de compuestos nitrogenados no proteicos (NNP), que de otra forma apenas serían utilizables. El rumen puede considerarse como una cuba de fermentación líquida o semisólida sumamente compleja y eficaz que contiene miles de millones de microorganismos por mililitro. La proporción relativa de los distintos microorganismos cambia sustancialmente con los diferentes tipos de alimentos consumidos, puesto que esta adaptación de las poblaciones microbianas requiere tiempo, por ello conviene evitar los cambios bruscos en la alimentación, las modificaciones importantes de la dieta deben realizarse gradualmente (Bath, L. *et al.*, 1982).

Los carbohidratos más abundantes producidos por las plantas son los almidones y las celulosas. De los carbohidratos de los granos de cereales, la mayor proporción corresponde al almidón, en tanto que las hojas y los tallos, que son las partes estructurales de las plantas, contienen gran cantidad de celulosas y carbohidratos complejos. Los no rumiantes como el hombre, que son capaces de digerir el almidón y los azúcares sencillos, no pueden, sin embargo, digerir la celulosa. Sin los microorganismos del rumen, el ganado vacuno se diferenciaría

poco de los animales monogástricos. Los microorganismos del rumen convierten con mucha eficiencia la celulosa y compuestos afines como la hemicelulosa en productos que pueden utilizarse como fuente de energía para el animal. Los productos formados son, fundamentalmente los ácidos acético, propiónico y butírico, que reciben la denominación general de ácidos grasos volátiles (AGV).

Puesto que gran parte de los carbohidratos de los forrajes son celulosa y compuestos afines, el ganado vacuno puede utilizar estos alimentos como una importante fuente de energía. Aproximadamente el 60-80 % de la energía utilizable por el ganado vacuno procede de los AGV. Los microorganismos del rumen también convierten los azúcares sencillos y los almidones en AGV, aunque no siempre es lo más importante para la nutrición animal. En algunas circunstancias pueden producirse grandes cantidades de ácido láctico en perjuicio del animal.

Otra gran función de los microorganismos del rumen es la utilización de los compuestos que poseen nitrógeno no proteico (NNP), para sintetizar proteína o aminoácidos, si existen carbohidratos que proporcionen la energía necesaria. Esto le permite al ganado vacuno consumir compuestos nitrogenados sintéticos o residuales para sintetizar una proteína de alta calidad, de gran valor para la nutrición humana.

Los microorganismos del rumen también producen grandes cantidades de bióxido de carbono y metano, que normalmente son eliminados del rumen por eructación, así como por absorción en la sangre. Si no se eliminaran los gases se produce una grave dilatación del rumen conocida como timpanismo.

2.3.1 Absorción y utilización de los ácidos grasos volátiles (AGV)

La mayor parte de los AGV producidos en el rumen se absorben directamente a través de la pared del rumen y en cantidades menores en el retículo, omaso e intestino grueso. Tras la absorción, el metabolismo y la utilización de acetato, propionato y butirato son muy diferentes.

En los tejidos del ganado el propionato es convertido en glucosa. Puesto que los microorganismos del rumen utilizan y fermentan los almidones presentes,

queda muy poca cantidad de glucosa para ser absorbida tras la digestión de los alimentos. La transformación del propionato en glucosa en los tejidos, es muy importante, ya que la glucosa es el punto de partida para la formación de la lactosa en la leche.

Además, la glucosa no sólo es una fuente importante de la energía para la síntesis de la leche, sino que es el precursor de la fracción de glicerol en la molécula de grasa de la leche. El acetato no se convierte tan fácilmente en glucosa, sino que se utiliza como precursor de los ácidos grasos de la leche, por el tejido mamario. Hasta el 50% de los ácidos grasos de la leche derivan del acetato. El acetato, el propionato y el butirato se utilizan como fuente de energía en numerosas reacciones muy complejas que tienen lugar en los tejidos corporales (Miller, 1989).

2.4 Importancia de los nutrientes para la secreción láctea

Teniendo en cuenta que la finalidad del ganado vacuno lechero es la producción de leche, se ha prestado una atención especial a la administración de los nutrimentos necesarios para una óptima producción de leche. Las vacas lecheras de alta producción segregan diariamente una gran cantidad de nutrientes de alta calidad para el consumo humano. Consecuentemente, para mantener una elevada producción se necesita de una cantidad enorme de la mayoría de los nutrientes, superior a la de la suma de las demás funciones, además de la óptima utilización de muchos nutrientes de la ración. De hecho, una alta producción hace que las cantidades necesarias para mantenimiento sean relativamente menores, lo cual explica la alta eficiencia de la vaca lechera en comparación con los animales de carne.

La eficiencia total en la conversión de los nutrientes específicos en nutrientes de la leche varía notablemente. Normalmente la leche producida contiene aproximadamente, 17 % de la energía y 25 % de la proteína consumida por la vaca durante el transcurso de su vida (Miller, 1989).

2.5 Digestibilidad

El valor nutritivo de los diferentes forrajes, incluso de la misma especie, varía enormemente, aunque la diferencia es menor entre los granos y demás concentrados. Teniendo en cuenta las variaciones en el contenido de los nutrientes y el costo de los mismos, es crucial la investigación de estos para la alimentación práctica del ganado.

La gran variabilidad existente entre la naturaleza de los alimentos y forrajes, hace totalmente imposible la valoración exacta de los alimentos para todos los nutrientes, a partir de algunas determinaciones sencillas. La mayoría de estas determinaciones se realiza mediante técnicas químicas o métodos biológicos, aunque en muchos de los casos se incluyen ambos tipos de determinaciones.

Uno de los principales métodos biológicos para la valoración de los alimentos es la digestibilidad, el conocimiento y la comprensión de lo que es el uso de un nutrimento es indispensable para poder evaluar los alimentos o para definir las necesidades de ellos en el desarrollo de patrones de alimentación para los animales (una recopilación de las necesidades nutricionales ante diversas situaciones). La utilización de un nutrimento que proviene de cierta clase de alimentos puede sufrir alteraciones según la clase de alimentos, la clase de aparato digestivo, la especie animal, edad, el nivel de consumo (plano de nutrición), procesamiento del alimento, las necesidades de nutrimento, enfermedades, parasitismo y condiciones adversas de varias clases.

Uno de los parámetros utilizados para evaluar la digestibilidad de materia seca digerida, es la técnica *in vitro*, la cual fue desarrollada en los pasados 40 años, tal como la técnica *in vitro* de Tilley y Ferry, (1963), otra técnica es la pepsina-celulosa (Mcleod y Minson, 1978; Aufrère y Michalet-Doreau, 1988) y la técnica de cuantificación de gas (Gosselink *et al*, 2004).

Digestibilidad *In vivo*

La digestibilidad definida como la porción del alimento aparentemente digerido en el tracto digestivo.

Una desventaja de la metodología *in vivo* es que, para cada materia prima, dan un valor único que sólo es aplicable en las condiciones de alimentación experimentales. De esta forma no se tiene la información sobre el ritmo de degradación y tampoco se pueden hacer correcciones para el período de permanencia en el rumen, que pueden variar en otros regímenes alimenticios. A pesar de la ambigüedad que representa el hecho de que, con estos métodos, se obtengan valores absolutos, se ha conseguido una extensa información sobre el metabolismo proteico en el rumen. No obstante, estos métodos no son adecuados para el análisis del gran número de ingredientes empleados en la formulación de piensos compuestos (Verité *et al.*, 1987).

Digestibilidad *In vitro*

Tras el objetivo principal de la determinación de digestibilidad, el método *in vitro* consiste en la determinación de la degradación de forraje, mediante la acción de enzimas o microorganismos obtenidos del rumen, mediante técnicas de laboratorio, logrando simular condiciones de fermentación similares a las de rumen.

Digestibilidad *In situ*

El fundamento de la técnica *in situ* se empleó por primera vez para calcular la digestibilidad de hojas administradas al ganado ovino en cápsulas perforadas de latón. En el método actual los alimentos se colocan en bolsas porosas de nylon y éstas se suspenden en el rumen mediante una intervención quirúrgica (**Fig. 1**). Este método ha sido empleado con resultados diversos durante este siglo pero fue Orskov (1978), el primero en apuntar la posibilidad de emplearlo para determinar los valores de la degradabilidad de las proteínas, y se usa en el sistema propuesto por el Agricultural Research Council (ARC) y ha sido usado por diversos investigadores.



Figura.1 Bolsas de nylon que contienen muestra en estudio de digestibilidad *in situ*.

El interés del método radica en la posibilidad de establecer la secuencia de ritmo de la degradación proteica. También permite el empleo de animales alimentados con raciones comercializadas y, aunque exige una intervención quirúrgica, puede aplicarse a un mayor número de materias primas que los métodos *in vivo*.

Una ventaja más es la capacidad de estudiar el valor nutritivo de los residuos del alimento incubado en el rumen, con fin de estimar la contribución cualitativa de la proteína no degradada que llega al duodeno (Maynar *et al.*, 1987).

Con este método pueden cometerse errores si no se presta la consideración adecuada a la posible pérdida de partículas muy pequeñas presentes en las bolsas, el tamaño de las partículas del alimento colocado en las bolsas o a las dietas administradas a los animales experimentales (**Fig. 2**). El método *in situ* define y ordena los alimentos de acuerdo con el ritmo y el potencial de degradación. Según Miller, (1989) el tiempo de incubación requerido para estimar la degradabilidad potencial de la materia seca, de los componentes de la pared celular o de cualquier otra fracción no ha sido del todo acordada, ya que se menciona que el valor se alcanza al cabo de 48 a 120 h de incubación o permanencia en el rumen, mientras que por otra parte se propone para los concentrados, de 24 a 60h en forrajes de buena calidad y de 48 a 72h para forrajes de mala calidad Soto (1995). Orskov (1978) sugiere determinar la amplitud de la

degradación cuando haya desaparecido de las bolsas el 90% de la materia seca digestible. Una tercera posibilidad consiste en determinar un ritmo constante de desaparición, a partir de la representación logarítmica de la proporción de nitrógeno que permanece en el residuo no degradado.

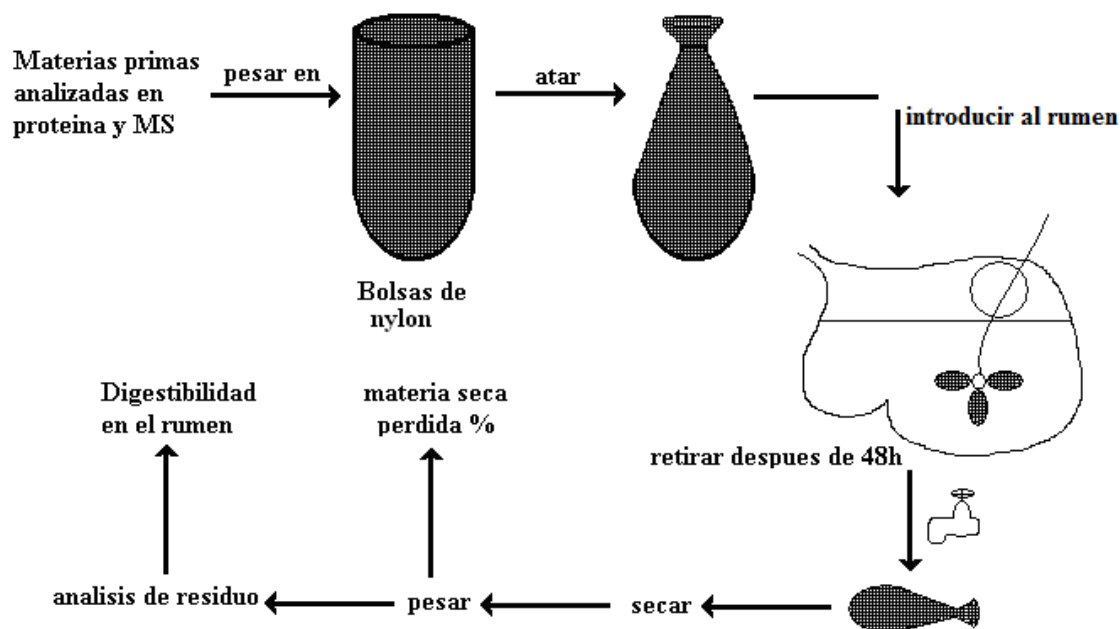


Figura 2. Diagrama de técnica de digestibilidad *in situ*

2.6 Alimentos para animales

Se puede definir a un alimento como cualquier componente de una ración que tiene alguna función útil. La mayoría de los alimentos son una fuente de uno o más nutrimentos, pero los ingredientes pueden incluirse para suministrar volumen, disminuir la oxidación de los nutrimentos que se oxidan fácilmente, emulsificar las grasas, proporcionar sabor, color u otro factor que se relaciona con la aceptabilidad, en vez de servir estrictamente como una fuente de nutrimentos. Los compuestos medicinales se excluyen por lo general. La clasificación usual de los alimentos para animales, se presenta a continuación por United States-Canadian tables of Feed Composition (Church y Pond, 1987):

Forrajes de fibra

Pastos de corte, pastos de agostadero y plantas en general que se proporcionan verdes (plantas de pastoreo, en crecimiento, latentes, picado en verde, residuos de conservas y cultivos alimenticios).

Forrajes secos y forrajes de fibra

Heno (leguminosas, no leguminosas como pastos, henos de cereales)

Pajas y granzas

Pienso y rastrojos

Otros productos con >18% de fibra cruda (olotes de maíz, cáscaras y vainas, bagazo de caña de azúcar, cascarillas de semilla de algodón, subproductos de la despepitadora de algodón, desechos animales).

Ensilados

Maíz, Sorgo, Pasto, Pastos y leguminosas, Leguminosas y Diversos.

Concentrados

Granos de cereales, subproductos de la molienda, principalmente de los granos de cereales, melazas de diferentes clases, desperdicios del cribado de las semillas y de la molienda, pulpa de remolacha y cítricos, grasas de animales y vegetales, suero y diversos (subproductos de cervecería, desechos de las plantas procesadoras de alimentos, frutas, vegetales y nueces de deshecho, basura, raíces y tubérculos, desechos de la panadería).

Concentrados proteicos

Harinas de semillas oleaginosas, semillas de algodón, soya, linaza, etc., harinas de carne animal o carne y hueso, harinas marinas, harinas de subproductos aviarios, semillas (enteras) de plantas. Subproductos de la molienda, granos desecados de destilerías y cervecerías, leguminosas deshidratadas, fuentes unicelulares (bacterias, levaduras, algas), nitrógeno no proteico (urea, etc.) y abonos secos.

Otros.

2.7 Ensilado

Desde hace muchos años se utiliza el ensilado para alimentar a los animales, principalmente a los rumiantes. Este es un material producido por medio de la fermentación controlada de los forrajes que tienen una elevada cantidad de humedad. Cuando dicho material se almacena en condiciones anaerobias, y si la cantidad de glucidos fermentables es adecuada, se produce suficiente ácido láctico para estabilizar la masa, de manera que se suspenda la fermentación. Si no se descubre o mueve el ensilado se conservará durante un periodo indefinido. Otros métodos alternos, los que principalmente se utilizan en Europa, requieren de la adición de ácidos fuertes que bajan el pH y facilitan su conservación (Haresing, W y Cole D.J.A., 1998).

El ensilado de buena calidad es un producto con bastante aceptabilidad el cual se utiliza convenientemente, y pueden obtenerse resultados excelentes en animales de alta productividad. Además de cualquier ventaja que tenga sobre la cosecha o en propiedades nutrimentales, la fermentación que se lleva a cabo disminuirá en forma considerable el contenido de nitrato, si este se encuentra presente.

2.7.1 Cambios químicos que se presentan durante la fermentación

Los cambios químicos son el resultado de la actividad enzimática de la planta y de la acción de los microorganismos que se encuentran presentes en las plantas forrajeras o que logran introducirse a estas por otras vías. Las enzimas de las plantas continúan activas durante los primeros días después del corte mientras el oxígeno se encuentra disponible, lo que ocasiona el metabolismo de los glúcidos solubles a CO₂, agua y calor. Se dice que las temperaturas óptimas durante la fermentación deben estar entre 26.6° y 37.7° C.

Las proteínas de las plantas se degradan parcialmente debido a la acción de las enzimas celulares, lo que trae como consecuencia un aumento de los compuestos de nitrógeno no proteico (NNP), como los aminoácidos. Los

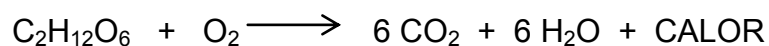
microorganismos anaerobios se multiplican en forma muy rápida al utilizar los azúcares y almidones como fuente principal de energía y así producir principalmente ácido láctico, cantidades menores de ácido acético y pequeñas cantidades de otros ácidos como el fórmico, ácido propiónico y ácido butírico; se encuentra muy poco ácido butírico en el ensilado bien conservado. Se presenta una acción continua en los compuestos que contienen Nitrógeno (N) con una mayor solubilización y producción de amoníaco y de otros compuestos de Nitrogeno no Proteico (NNP). La cantidad de ácido láctico se eleva en el ensilado de maíz y sorgo bien conservado, con niveles que llegan a 7 u 8% y el pH desciende hasta alrededor de 4.0, lo cual depende de la capacidad amortiguadora y del contenido de materia seca del cultivo en estudio. Los ensilados de pasto tendrán generalmente un pH más elevado (4.5). Si el ensilado está muy húmedo o el suministro de glúcidos solubles es muy bajo, el pH no descenderá a niveles tan bajos y se permitirá el desarrollo de especies bacterianas del genero *Clostridium*, en la producción de cantidades relativamente elevadas de ácido butírico y una fermentación adicional de los compuestos de NNP; lo que trae como consecuencia la producción de aminas biogenas como la triptamina, la histamina y otras. Estas aminas tienen olores y sabores desagradables y pueden ser tóxicas. Por otro lado, si la masa está demasiado seca o mal compactada, puede producirse un calor excesivo, se desarrollarán hongos, lo que producirá un ensilado de poca aceptabilidad y, en algunas ocasiones, hasta tóxico. Para la mayoría de cultivo, un contenido de materia seca aproximadamente de 35% y un contenido de glúcidos solubles de 6 a 8%(base seca) son los niveles casi óptimos para la producción del ensilado. Consecuentemente, si se piensa fabricar un ensilado de pasto o de leguminosas, por lo general, se deshidrata un poco antes de ensilarlo. Si se utiliza forraje recién cortado, estará demasiado húmedo para producir un buen ensilado, porque permitirá que se multipliquen bacterias del genero *Clostridium*. Cuando las plantas forrajeras como el pasto o las leguminosas se cortan directamente y se ensilan, en muchos casos se agregan conservadores o esterilizantes. Pueden utilizarse materia seca adicional para absorber parte de la humedad y agregarse algunos glúcidos solubles en la forma de granos o de melaza; estos conservan el

ensilado a base de pastos y leguminosas. Los esterilizantes de ensilados, como el ácido fórmico, el dióxido de azufre, o el metabisulfito de sodio pueden ser ventajosos cuando la humedad que contiene es elevada, pero su valor es dudoso en los ensilados que se preparan con pastos secos o con leguminosas o a partir de maíz o de plantas de sorgo (Church y Pond, 1998).

2.7.2 El proceso del ensilaje

El ensilaje es una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias productoras de ácido láctico (BAL) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHOS) del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción. Una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, el proceso del ensilaje se puede dividir en cuatro fases (Weinberg y Muck, 1996; Merry *et al.*, 1997) o en 2 etapas principales, fase aeróbica o de respiración y fase anaerobia o de fermentación (Cobos, 1990).

Fase 1 - Fase aeróbica. En esta etapa la presencia de oxígeno ya sea entre el forraje compactado o el que se haya en el espacio intersticial de las plantas, permite que las células vegetales continúen respirando y por consiguiente la combustión de la materia orgánica, degradando principalmente a los carbohidratos solubles. Esta acción es de tipo enzimática y se realiza tanto por enzimas de origen vegetal como por enzimas de microorganismos aeróbicos. En forma sencilla, la reacción química es la siguiente:



En esta reacción se puede apreciar que a partir de carbohidratos y aire se produce CO₂, agua y calor, todo lo cual va en detrimento de la calidad nutritiva del producto, ya que la producción de CO₂ y el desprendimiento de calor, disminuye el contenido de materia orgánica y el contenido energético, aunado a esto, la

producción de agua aumenta las pérdidas debido a la lixiviación de nutrientes. En esta fase también se puede ver afectada la segunda fase o fermentación láctica, por efecto de la temperatura. Woolford (1984) menciona que la temperatura óptima para el desarrollo de bacterias lácticas es de 30° C. En ensilados mal compactados, la temperatura de la biomasa puede alcanzar hasta 60° C, inhibiendo el desarrollo de bacterias lácticas y permitiendo el desarrollo de otros microorganismos termófilos como bacterias productoras de ácido butírico y acético así como de Clostridios.

Otro aspecto negativo de esta fase lo constituye la hidrólisis de proteínas y desaminación de aminoácidos, pues la acción enzimática puede llegar hasta la degradación del 50-60% de la proteína del forraje ensilado.

En esta fase es de gran importancia puesto que la producción de ácidos débiles como el acético y butírico permiten la acidificación del forraje al pH deseable (entre 3.5 y 4.0) e impiden la producción de CO₂ y amoníaco permitiendo la proliferación de bacterias clostridium y hongos, los cuales terminan por afectar el valor nutritivo del ensilado.

Esta fase que dura sólo pocas horas el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos como las levaduras y las enterobacterias. Además hay una actividad importante de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas, siempre que el pH se mantenga en el rango normal para el jugo del forraje fresco (pH 6,5-6,0).

Fase 2 - Fase de fermentación. A medida que el oxígeno comienza a desaparecer otro tipo de bacterias llamadas anaerobias facultativas se desarrollan. Siendo de primera importancia las bacterias formadoras de ácido láctico ya sean homofermentativas o heterofermentativas. Los principales géneros de bacterias lácticas encontradas en un ensilado son *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. La actividad fermentativa de estas bacterias sobre carbohidratos solubles o de fácil fermentación producen principalmente ácido láctico, (también se producen ácido acético, butírico y propiónico en cantidades menores), produciéndose la acidificación del material ensilado a valores entre 3.5 y 4. Al bajar

el pH se inhibe la actividad de las bacterias incluso de las bacterias lácticas que son las principales responsables de la acidez de un ensilado.

En esta fase también hay bacterias (incluso lácticas) que actúan enzimáticamente sobre la fracción proteínica produciendo aminoácidos libres y aminas. Esta actividad proteolítica se realiza en ensilados de buena como pobre calidad y su efecto está determinado por el tiempo que tarda en disminuir el pH, puesto que a valores inferiores a 4.5 estas bacterias se inactivan.

El establecimiento de una microflora láctica y la disminución del pH son de primordial importancia ya que se ha demostrado que cuando el pH no es menor a 4.0, se puede llevar a cabo una segunda fermentación causada por bacterias del género *Clostridium*. Estas bacterias a partir de proteínas por medio de un proceso de descarboxilación o desaminación producen amoniaco, CO₂ y aminas, y a partir de carbohidratos y ácido láctico, ácido butírico, acético y CO₂. Todo lo cual conlleva a un detrimento en el valor nutritivo del ensilado. Además produce un aumento en el pH lo que permite el desarrollo de otras bacterias y hongos que terminan por afectar el valor nutritivo del producto.

El éxito de esta segunda fase depende del desarrollo de una fermentación de tipo láctica lo cual a su vez depende de cuatro factores básicos:

- 1) Contenido de humedad en el material a ensilar;
- 2) Ausencia de aire en el material a ensilar;
- 3) Presencia de azúcares de fácil fermentación y
- 4) Capacidad buffer del material a ensilar.

Estos factores han sido ampliamente revisados por Woolford (1990), quien indica los cuidados que se deben tener para lograr un buen proceso de ensilaje (**Cuadro 1**) sin variaciones significativas en el contenido de nutrientes.

Cuadro 1. Características químicas de un ensilado.

	Ensilado de buena calidad	Ensilado de mala calidad
pH	< 4.0	> 4.0
Ácido láctico (%MS)	> 3.0	< 3.0
Ácido acético, (%MS)	≤ 2.5	> 2.5
Ácido butírico	< 1.0	> 1.5
Amoniaco (% N Total)	< 5	> 1.0
Nitrógeno (% N Total)	> 50	< 50

Fuente: Wilkinson, 1996

A nivel práctico, es posible controlar el contenido de humedad del material a ensilar que se recomienda debe ser entre 60-70%, así como minimizar la presencia de aire. Sin embargo, no siempre es posible conocer el contenido de carbohidratos de fácil fermentación y la capacidad buffer del material a ensilar, valores que incluso pueden variar en un mismo forraje por efecto de grado de madurez, especie, variedad, partes de la planta, características de suelo, abonado y condiciones ambientales, por lo que cuando se realiza un ensilaje en muchas ocasiones queda la duda de si se va a obtener el producto deseado.

Fase 3 - Fase estable. Mientras se mantenga el ambiente sin aire, ocurren pocos cambios. La mayoría de los microorganismos de la Fase 2 lentamente reducen su presencia. Algunos microorganismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo; otros, como clostridios y bacilos, sobreviven como esporas. Sólo algunas proteasas y carbohidrasas, y microorganismos especializados, como *Lactobacillus buchneri* que toleran ambientes ácidos, continúan activos pero a menor ritmo.

Fase 4 - 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, pero puede ocurrir antes de iniciar la explotación por daño de la cobertura del silo (p. ej. roedores o pájaros). 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.

2.7.3 La microflora del ensilaje.

La microflora del ensilaje juega un papel clave para el éxito del proceso de conservación. Puede ser dividida en dos grupos principales: los microorganismos benéficos y los microorganismos indeseables. Los microorganismos benéficos son los microorganismos del género de las BAL. Los indeseables son aquellos organismos que causan el deterioro anaeróbico (p. ej. clostridios y enterobacterias) o deterioro aeróbico (ej. levaduras, bacilos, *Listeria* sp. y mohos). Muchos de estos organismos indeseables no sólo reducen el valor nutritivo del ensilaje sino que pueden además afectar la salud de los animales o alterar la calidad de la leche, o ambas (p. ej.: *Listeria* spp., *clostridios*, hongos y bacilos).

Microorganismos benéficos - Bacterias que producen ácido láctico (BAL)

Las bacterias BAL pertenecen a la microflora epifítica de los vegetales. Su población natural crece significativamente entre la cosecha y el ensilaje. Esto se explica por la reactivación de células latentes y otras no cultivadas, y no por la inoculación de las máquinas cosechadoras o por el simple crecimiento de la población original. Las características del cultivo como, contenido de azúcares, contenido de materia seca y composición de los azúcares, combinados con las propiedades del grupo BAL así como su tolerancia a condiciones ácidas o de presión osmótica, y el uso del substrato, influirán en forma decisiva sobre la

capacidad de competencia de la flora BAL durante la fermentación del ensilaje (Woolford, 1984; McDonald *et al.*, 1991).

Las BAL que se asocian con el proceso de ensilaje pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. La mayoría de ellos 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 aeróbicos facultativos, pero muestran cierta preferencia por la condición anaeróbica (Devriese *et al.*, 1998).

Tomando en cuenta su metabolismo de los azúcares, los miembros de las BAL pueden ser clasificados como homofermentadores, heterofermentadores facultativos u obligados. Los homofermentadores producen más de 85% de ácido láctico a partir de hexosas (azúcares C₆) como la glucosa, pero no pueden degradar las pentosas (azúcares C₅) como la xilosa.

Los heterofermentadores facultativos también producen principalmente ácido láctico a partir de hexosas, pero además pueden degradar algunas pentosas produciendo ácido láctico, ácido acético y/o etanol. Los heterofermentadores obligatorios degradan las hexosas y las pentosas, pero se distinguen de los homofermentadores en que degradan las hexosas en proporciones equimolares de ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol. Los homofermentadores obligatorios reúnen especies como *Pediococcus damnosus* y *Lactobacillus ruminis*. Los heterofermentadores facultativos incluyen a *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* y *Enterococcus faecium*. Los heterofermentadores obligatorios incluyen miembros del género *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* como *L. brevis* y *L. buchneri* (Devriese *et al.*, 1998)

Microorganismos indeseables en el ensilado

a) Levaduras

Son microorganismos unicelulares, ovoides, esféricas y cilíndricas, eucarióticos, anaeróbicos facultativos y heterotróficos. Las levaduras prosperan típicamente en hábitat con azúcares, como frutos, flores y cortezas de árboles, sus células son mucho más grandes que las bacterias y pueden distinguirse de ellas no solo por su tamaño sino también por poseer sistemas membranosos intracitoplasmáticos así como el núcleo. En todo ensilaje, tanto la actividad de levaduras anaeróbicas como aeróbicas son indeseables. Bajo condiciones anaeróbicas las levaduras fermentan azúcares produciendo etanol y CO₂ (McDonald *et al.*, 1991). Bajo condiciones aeróbicas, muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico en CO₂ y H₂O. La degradación del ácido láctico eleva el valor del pH del ensilaje, lo cual a su vez permite el desarrollo de otros organismos indeseables (McDonald *et al.*, 1991).

Las poblaciones de levaduras pueden alcanzar hasta 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo durante las primeras semanas del proceso de ensilaje; un período prolongado de almacenaje reduce gradualmente la presencia de levaduras (Jonsson *et al.*, 1990; Driehuis y van Wixselaar, 1996). 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 (Pahlow y Honing, 1996), mientras que un contenido elevado de ácido fórmico o ácido acético reducen su supervivencia (Driehuis y van Wixselaar, 1996; Oude Elferink *et al.*, 1999).

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 como 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 (Ashbell *et al.*, 1995; Weinberg y Muck, 1996; Driehuis y van Wixselaar, 1996).

b) Enterobacterias

Las enterobacterias son organismos anaeróbicos facultativos, Gram negativos, catalasa negativa, bacilos no esporulados, inmóviles o móviles por flagelos de inserción peritrica y catalasa negativa. Se considera que la mayoría de las enterobacterias presentes en el ensilaje no son patógenas. Pese a ello su desarrollo en el ensilaje es perjudicial porque compiten con los integrantes del BAL por los azúcares disponibles, y porque además pueden degradar las proteínas. La degradación proteica no sólo causa una reducción del valor nutritivo del ensilaje, sino que también permite la producción de compuestos tóxicos tales como aminas biogénicas y ácidos grasos de cadena múltiple.

Se sabe que las aminas biogénicas tienen un efecto negativo sobre la palatabilidad del ensilaje (Woolford, 1984; McDonald *et al.*, 1991), especialmente en animales todavía no acostumbrados a su sabor (Van Soest *et al.*, 1991). Más aún, el amoníaco generado por la proteólisis aumenta el poder tampón del forraje ensilado, lo cual se opone a toda tendencia para un descenso rápido del pH del ensilaje. Un atributo particular de las enterobacterias es su habilidad en el proceso de ensilaje, para reducir el nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2). Las enterobacterias en el ensilaje pueden luego degradar el nitrito en amoníaco y óxido de nitrógeno (NO_2), pero este también puede ser transformado en monóxido de nitrógeno (NO) y nitrato.

En presencia de aire, el NO es oxidado produciendo una mezcla de gases, óxidos amarillo-marrones de nitrógeno (NO_2 , N_2O_3 , N_2O_4). Los gases de NO y NO_2 dañan el tejido pulmonar y pueden causar enfermedades con síntomas parecidos a la neumonía, conocida como enfermedad del ensilaje (Woolford, 1984). Para evitar el contacto de los animales con estos gases de nitrógeno se recomienda que no sean estabulados cerca de los silos cuando se llena el silo o durante su primera semana de almacenaje. A pesar de estos problemas, se considera útil que ocurra una leve reducción de nitritos, ya que los nitritos y el NO que se generan son inhibidores muy potentes de los clostridios y mejoran la calidad del ensilaje.

Las enterobacterias no proliferan en ambientes con valores bajos de pH. Las técnicas de ensilaje que aseguren un rápido y significativo descenso del pH en el ensilaje, provocarán una inhibición del desarrollo de las enterobacterias (McDonald *et al.*, 1991).

c) Clostridios

Los clostridios son bacterias anaeróbicas que forman endosporas, Gram positivas, anaerobias y fermentadoras para producir ácido butírico, presentes en el suelo. Muchas de ellas pueden fermentar tanto carbohidratos como proteínas, por lo cual disminuyen el valor nutritivo del ensilaje y al igual que las enterobacterias crean problemas al producir aminos biogénicos. Además, la presencia de clostridios en el ensilaje altera la calidad de la leche ya que sus esporas sobreviven después de transitar por el tracto digestivo y se encuentran en las heces; esto puede resultar en la contaminación de la leche, ya sea directamente o por ubres mal aseadas. La especie de mayor importancia en las lecherías es *Clostridium tirobutyricum*, un organismo ácido tolerante. Además de poder fermentar carbohidratos, *C. tirobutyricum* también puede degradar el ácido láctico en ácido butírico, H₂ y CO₂.

Serios problemas de salud pueden ser causados por ciertos tipos de clostridios. Una especie extremadamente tóxica es *Clostridium botulinum* que provoca el botulismo, y puede ser fatal para el ganado bovino. Afortunadamente, *C. botulinum* tiene una baja tolerancia a medios ácidos y por ello no se desarrolla en ensilajes bien fermentados. El botulismo en los animales es causado por ingestión de ensilaje contaminado con *C. botulinum* y corresponde casi siempre a la descomposición de un cadáver (p. ej.: ratón, pájaro) dentro del ensilaje.

Un "ensilaje clostridial" típico muestra un alto contenido de ácido butírico (más de 5 g/kg de MS), un pH alto (>5 en ensilajes con bajo contenido de MS), y alto contenido tanto de amoníaco como de aminos. Las técnicas de ensilaje que permiten una caída rápida y significativa del pH evitarán el problema, puesto que tanto el desarrollo de enterobacterias como de clostridios se inhibe con valores bajos de pH.

Por otro lado, los clostridios muestran mayor susceptibilidad a la falta de humedad (o sea, bajo valor a_w , baja actividad acuosa) que los integrantes del BAL (Huantaned *et al.*, 2002). Por ello, toda medida tomada para disminuir el valor a_w de un forraje, como inducir su marchites y por ende aumentar el valor del contenido de MS, permite la inhibición selectiva de clostridios (Wagness y Mueller, 1991). Por último, los nitritos y el NO u otros compuestos que puedan ser degradados en el ensilaje para producirlos, también inhibirán el desarrollo de los clostridios (Sinclair *et al.*, 2004).

d) *Bacterias productoras de ácido acético*

Las bacterias del ácido acético forman un grupo de bacilos, llevan a cabo la oxidación incompleta de alcoholes y de azúcares, lo que conduce a la acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Con etanol como sustrato, se produce ácido acético, de aquí el nombre trivial de este grupo bacteriano.

Estas bacterias son Gram negativos, ácido tolerantes, son un conjunto heterogéneo (con flagelos, polares y peritricos) y aeróbicas obligatorias. Hasta la fecha, todas estas bacterias aisladas de muestras de ensilaje pertenecen al género *Acetobacter* (Sibanda *et al.*, 1997). La actividad de *Acetobacter* spp. en el ensilaje es perniciosa porque puede iniciar el deterioro aeróbico, ya que puede oxidar el lactato y el acetato produciendo CO₂ y agua. Generalmente, las responsables principales del inicio del deterioro aeróbico son levaduras; las bacterias acéticas se encuentran ausentes o juegan un papel poco importante en este problema. No obstante, existe evidencia que estas bacterias pueden iniciar un deterioro aeróbico en el ensilaje de maíz cuando incluye toda la planta, grano y forraje. Por otro lado, la inhibición selectiva de las levaduras también puede aumentar la proliferación de bacterias que producen ácido acético en el ensilaje (Driehuis y van Wakselaar, 1996).

e) *Bacilos*

Los *bacilos* se asemejan a los clostridios: son bacterias de forma cilíndrica que forman esporas, Gram positiva, Sin embargo, se pueden distinguir fácilmente ya que son aeróbicos facultativos, mientras que los clostridios son todos anaeróbicos obligatorios. Los *bacilos* aeróbicos facultativos fermentan un amplio rango de carbohidratos generando compuestos tales como ácidos orgánicos (p. ej.: acetatos, lactatos y butiratos) o etanol, 2,3-butanodiol y glicerol. Algunos *Bacillus* spp. son capaces de producir sustancias fungicidas, y se los ha usado para inhibir el proceso de deterioro aeróbico en ensilajes (Piltz *et al.*, 1999; Moran *et al.*, 1993). Con la excepción de estas especies, el desarrollo de los bacilos en el ensilaje es en general considerado como indeseable.

Esto se debe a que los bacilos no sólo son menos eficaces como productores de ácido láctico y acético comparado con el grupo BAL (McDonald *et al.*, 1991), si no que en las etapas finales, incrementan el deterioro aeróbico (Lattemae y Lingvall, 1996). Además, un alto número de esporas de *Bacillus* en leche fresca ha sido asociado con un alto número de esporas en heces frescas de vaca. Parece muy posible que, tal como ocurre en el caso de esporas de los clostridios, las esporas de *Bacillus* sean transferidas del ensilaje a la leche vía las heces. Las esporas psicrotróficas de *Bacillus cereus* son consideradas como los organismos más importantes del deterioro de la leche pasteurizada. Altas concentraciones de esporas psicrotróficas de *B. cereus* han sido detectadas en ensilajes (Glewen y Young, 1982).

Para disminuir el desarrollo de *Bacillus* en el ensilaje, la temperatura de almacenaje no debería ser muy alta y se deberá minimizar el ingreso de aire. Además se debe reducir toda contaminación inicial del ensilaje con tierra o estiércol (McDonald *et al.*, 1991).

f) *Mohos*

Los mohos son organismos eucarióticos, crecen en ambientes húmedos preferentemente, en material en descomposición y en zonas oscuras. Es fácil identificar un ensilaje infestado por mohos debido a los filamentos de diversos colores y de gran tamaño que producen muchas especies. 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 4) todo el ensilaje puede ser invadido por mohos. Las especies que se han identificado más frecuentemente en el ensilaje pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Byssochlamys*, *Absidia*, *Arthrinium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma* (Woolford, 1984; Frevel y Carroll, 1998; Jonsson *et al.*, 1990; Nour *et al.*, 1981). Los mohos no sólo disminuyen el valor nutritivo y la palatabilidad del ensilaje sino que también son un riesgo para la salud de los animales y las personas. Las esporas de mohos pueden asociarse a ciertas afecciones pulmonares y reacciones alérgicas (Maynard, 1987). Otros problemas de salud asociados con los mohos se relacionan con las micotoxinas (Abu *et al.*, 1996).

Dependiendo del tipo y la cantidad de toxina presente en el ensilaje, los problemas de salud pueden variar desde ligeras molestias digestivas, pequeños problemas de fertilidad y una disminución de las defensas naturales, hasta daños serios al hígado o a los riñones y abortos. Algunas especies de hongos que producen micotoxinas son: *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium roqueforti*, y *Byssochlamys nivea*. *P. roqueforti* es una especie ácido tolerante que puede desarrollarse aún en ambientes con muy poco oxígeno y alta concentración de CO₂ y ha sido detectada como una especie predominante en diversos tipos de ensilajes (Nour *et al.*, 1981).

Todavía existen muchas dudas sobre cuales son las condiciones bajo las que se producen las micotoxinas en el ensilaje. No todos los ensilajes fuertemente infestados por mohos tienen forzosamente una gran cantidad de micotoxinas, y no todos los tipos de micotoxinas que pueden producir los mohos se encuentran necesariamente en un ensilaje infestado (Nour *et al.*, 1981). Está confirmado que la

aflatoxina B1, una micotoxina de *Aspergillus flavus*, puede ser transferida del ensilaje a la leche. A pesar de esto, no se sabe si esto mismo puede ocurrir con micotoxinas de *P. roqueforti* o *A. fumigatus*.

Las técnicas de ensilaje que minimizan el ingreso de aire (p. ej. buena compactación y cierre hermético del ensilaje), y la inclusión de aditivos que inhiben el deterioro aeróbico, podrán prevenir o limitar el desarrollo de mohos.

g) *Listeria*

Los integrantes del género *Listeria* son cocobacilos aeróbicos o anaeróbicos facultativos, Gram positiva, pueden crecer en condiciones anóxicas estrictas, carece de catalasa, requiere de condiciones microaerofilas y son catalasa positiva. Con relación a los efectos negativos sobre la calidad del ensilaje, la especie mas importante es el *L. monocytogenes*, anaeróbico facultativo, que es una especie patogénica para varios animales y para el hombre. Los animales que tienen su sistema inmune temporalmente inhibido (p. ej. hembras preñadas y neonatos) son muy susceptibles a infecciones de *L. monocytogenes*.

El ensilaje contaminado con *L. monocytogenes* ha sido asociado con casos fatales de listeriosis en ovejas y cabras (Windsor y Barlow, 1982). Además, Rider (1997) ha señalado que el uso de ensilaje de mala calidad ha sido una de las fuentes principales de contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes*. El desarrollo y supervivencia de *Listeria* spp. en el ensilaje están determinados por fallas en asegurar un ambiente anaeróbico, y por el pH del ensilaje. *L. monocytogenes* puede tolerar bajos niveles de pH entre 3,8 a 4,2 por largos períodos siempre que exista oxígeno, aún a bajas concentraciones. Sin embargo, en un ámbito estrictamente anaeróbico, aperece rápidamente al existir un valor bajo de pH.

Los ensilajes con mayor susceptibilidad al deterioro aeróbico superficial, como es el caso de ensilajes en grandes pacas, parecen estar particularmente propensos a la contaminación con *Listeria* (Fagbenro y Bello, 1997). Generalmente *L. monocytogenes* no se desarrolla en ensilajes bien fermentados que tienen un

nivel bajo de pH. Hasta el momento, el mejor método para prevenir el desarrollo de *L. monocytogenes* es mantener un ámbito anaeróbico (McDonald *et al.*, 1991).

2.7.4 El ensilaje como una alternativa para los desechos orgánicos

Tradicionalmente, la mayoría de los desechos empleados en la alimentación animal son cocidos para esterilizarlos y luego, si no son usados inmediatamente, deben ser deshidratados para facilitar su almacenaje y transporte. Este tipo de procesado se efectúa, cuando se dispone de grandes cantidades de producto cuyos aportes son estables y cuando el valor del producto final es de mediano a alto.

Si bien ciertos alimentos son regularmente cocidos por los pequeños agricultores y con buen resultado cuando se usan de inmediato, rara vez se hace uso de la deshidratación. Una excepción es el uso de productos pesqueros secados al sol. Lamentablemente, esto generalmente se realiza bajo condiciones poco higiénicas, de modo que el producto se contamina con bacterias.

En tales condiciones, cuando estos alimentos no pueden ser utilizados de inmediato y cuando se trata de cantidades reducidas, el ensilado es un procedimiento apropiado para su procesamiento y almacenaje.

Una gran variedad de productos orgánicos pueden ser ensilados. Sin embargo la decisión sobre cómo proceder y qué técnica usar va depender de:

- La composición del producto, incluyendo su contenido de MS;
- El tipo y el grado de la contaminación bacteriana (patogénica y fermentativa);
- La capacidad tampón de los componentes del producto;
- La presencia de bacterias autóctonas o de enzimas autolíticas;
- El acceso local a insumos para facilitar el ensilaje: ácidos, fermentos bacterianos, substratos fermentables;
- El costo total de la preservación usando las técnicas pertinentes en las condiciones locales.

Considerando los criterios anteriores, las posibles formas de ensilar podrían ser:

- Usar ácidos producidos por la fermentación de carbohidratos del producto por acción de las bacterias autóctonas o cultivos que se han inoculado;
- Usar ácidos producidos por la fermentación de aditivos ricos en carbohidratos, que se agregan al sustrato, generados por la acción de las bacterias autóctonas o cultivos que se han inoculado;
- Usar ácidos inorgánicos como clorhídrico o sulfúrico, o mezclas de ellos;
- Usar ácidos orgánicos como fórmico, propiónico o acético, o mezclas de ellos.

A) Subproductos agrícolas

La parte de los cultivos vegetales destinada al consumo humano y que actualmente se emplea para esta finalidad, habitualmente representa solo una fracción de la planta entera, de aquí que existan grandes cantidades de desperdicios potencialmente disponibles para piensos del ganado. Sin embargo por razones climáticas y económicas, la proporción actual de cosechas vegetales recogidas varía considerablemente. La infrautilización de estos productos normalmente significa que los residuos no usados de plantas deterioradas son arados para incrementar la fertilidad del suelo de cara al siguiente cultivo. Este proceso no constituye habitualmente un instrumento económico destinado a mejorar los niveles de materia orgánica y de nutrientes del suelo, por lo que la paja de guisantes, las coronas de remolachas azucarera y de zanahoria y los tallos de coles de bruselas, en ciertas circunstancias, pueden ser mejor aprovechadas para alimentar el ganado.

Ashbell *et al.* (1995) compararon las características del ensilado y la degradabilidad ruminal del ensilaje de trigo provenientes de cultivares tempranos y tardíos, en cuatro etapas de crecimiento: macollaje, floración, grano lechoso y grano pastoso. A pesar que la degradabilidad NDF del ensilaje de trigo más joven (brotes y floración) fue mayor que aquella para las etapas de granos lechosos y pastosos, los rendimientos de MS degradable y NDF (medidos como t/ha) aumentaron en función de una mayor madurez.

Bolsen *et al.* (1995) determinaron valores de digestibilidad MO *in vivo* de 69,2 y 70,5 por ciento y valores de digestibilidad NDF de 63,3 y 56,3 por ciento, para ensilajes de plantas completas de trigo cosechadas a la floración y con grano de pasta blanda, respectivamente. Por lo anterior se puede concluir que el valor nutritivo del ensilaje de trigo es fuertemente afectado por su grado de madurez en el momento de la cosecha ya que influye sobre el rendimiento, sobre la proporción entre grano y partes vegetativas y sobre el contenido y calidad de la MS y la pared celular.

Mustafa *et al.* (2004), empleo residuos de maíz dulce en la elaboración de microsilos. La muestra era proveniente del proceso de extracción azúcar de maíz en una planta en Ste-Martine, Quebec, Canadá. Contenía 22 % de materia seca, 9.8 % de proteína cruda, 59.4 % de fibra detergente neutro, 37.4 % de fibra detergente ácido y 9.8 MJ/kg de energía metabolizable. Se determinó que los residuos de maíz dulce pueden ser preservados en ensilado con mínimos cambios en la composición; comparado con ensilado de maíz, tuvo 12% menos de digestibilidad *in situ* de materia seca, considerando que el ensilado de maíz tuvo una digestibilidad *in situ* de 67.2 %.

B) Leguminosas

El coste de la energía destinada a producir nitrógeno y otros fertilizantes ha incrementado la atención sobre los sistemas agrícolas de policultivo que como rotación incluyen una cosecha de leguminosas. Se sospecha que una buena parte del incremento producido en la superficie adicional destinada al cultivo de estas especies se haya orientado a la alimentación animal.

C) Residuos de oleaginosas

La mayoría de estos cultivos se destinan a la producción de aceite comestible (por ejemplo: aceite de oliva y de palma) o industrial (por ejemplo: aceites de linaza y

colza). En tiempos pasados las semillas oleaginosas solían ser procesadas para el mercado de pienso del ganado.

D) Paja de hongos comestibles (cereales)

Al material sobre el que crecen los hongos se le llama sustrato, al cual degradan para su alimentación y desarrollo. Como las especies de *Pleurotus ostreatus* son lignocelulolíticas tienen la capacidad de degradar muchos sustratos, como los desechos y subproductos agroindustriales, se pueden utilizar algunos sustratos catalogados como basura, entre los que figuran un gran número de productos:

1. Pajas de ajonjolí, arroz, cebada, sorgo, trigo, avena, caña de azúcar.
2. Rastrojos de maíz, frijol, mijo y garbanzo.
3. Pulpa de café.
4. Bagazos de caña de azúcar, henequén, uva.
5. Forestales, aserrín, virutas, troncos y ramas.
6. Papel, hojas de piña, fibra de coco, hojas y tallo de plátano, desechos de la industria textil.

Algunas veces una combinación o mezcla de sustratos favorece mejor el desarrollo de los hongos (Harmond *et al.*, 1999).

Paja de trigo como ensilaje

La estabilidad aeróbica del ensilaje de la paja de trigo es variable. En climas calientes los microorganismos dañinos como las levaduras y los mohos proliferan más rápido, causando mayor deterioro aeróbico. En general, un gran número de factores puede afectar la estabilidad aeróbica, incluyendo la presencia de malezas, el manejo durante el ensilado (compactación y sellado), la composición del ensilado, tipo de aditivos, el método y tasa cotidiana de explotación al distribuir el ensilaje. En silos trinchera en clima caliente es importante que el frente de ataque del silo abierto en explotación sea removido frecuentemente, retirando porciones de 30 a 40 cm cada día, con el objeto de minimizar el efecto de la exposición al

aire. El deterioro aerobio del ensilaje de trigo se asocia con un aumento en la población de levaduras y mohos, recalentamiento, y consecuentemente, pérdidas de MS. El papel exacto del contenido de MS, carbohidratos solubles residuales y del ácido láctico sobre la desestabilización del ensilaje no se ha aclarado todavía. Tal como ocurre en otros ensilajes, los ácidos grasos volátiles como los ácidos acético, propiónico y butírico que se producen durante la fermentación del ensilado, inhiben las levaduras y los mohos. La presencia de mohos es un problema en el ensilaje de trigo por el riesgo a encontrar micotoxinas.

2.7.5 Efecto del procesado sobre la degradabilidad de la proteína en el rumen

Muchos tratamientos como el uso de formaldehído y de taninos. Reducen la degradación de la proteína en el rumen. Se ha demostrado que las condiciones más favorables de procesado proporcionan un neto incremento en el flujo de aminoácidos que avanza hacia el intestino delgado y en su absorción, aunque la respuesta varía de unos a otros. Cuando las vacas lecheras de alta producción son deficientes en proteína no degradada, los tratamientos de procesado pueden resultar muy ventajoso, pero estas materias no deberían hallarse superprotegidas para evitar que puedan recorrer el tubo digestivo sin beneficio para el animal.

La utilización de ensilados ha incrementado en las dietas para rumiantes porque es más práctica y rápido de usar, comparado con forrajes verdes. Sin embargo, el conocimiento acerca de la colonización microbiana de los ensilados y los efectos que causan esta en investigación. Es generalmente conocido que las proteínas de los ensilados tienen una alta digestibilidad en comparación del forraje verde, debido a la previa acción de la flora microbiana durante el proceso de ensilado. En algunas investigaciones (González *et al.*, 2006) ha sido observada la baja degradación de proteínas insolubles en el ensilado, lo cual ha sido asociado con la desnaturalización de las proteínas a causa de la acidificación durante el proceso de ensilaje.

González *et al.*, 2006 empleo centeno como forraje, señala que la permanencia prolongada de muestra en el rumen produce una reducción de la materia seca y por lo tanto una desaparición ruminal. Durante la preservación de

forraje hay pérdidas de componentes a causa de la oxidación de carbohidratos solubles, consecuentemente el agua generada durante este proceso reduce el contenido de materia seca, mientras que la desaparición de carbohidratos solubles inducen a un pasivo incremento de otros componentes como: minerales, fibra y proteína cruda. El incremento de proteína cruda fue asociado con la reducción de contenido de aminoácidos, como consecuencia de fermentación de proteína y un incremento en la proporción de detergente ácido en nitrógeno insoluble. Todos estos cambios reducen el valor nutritivo del forraje, por lo tanto los efectos del ensilado en la degradación de materia seca conforme la desaparición de carbohidratos solubles durante la maduración del ensilado y asociación pasiva con las fracciones de fibra. En particular, el incremento de detergente ácido en nitrógeno insoluble evidencia las reacciones entre carbohidratos y proteínas también como la parcial o total reacciones de Maillard (Van Soest, 1982).

2.7.6 Efecto del procesado sobre la apetencia y el consumo de pienso

En general, cuanto mas intenso es el procesado mayor será el efecto sobre la apetencia para el ganado y por consiguiente sobre el consumo voluntario. Las materias molidas son aceptadas habitualmente con mayor avidez que cuando se ofrecen enteras. Los productos expandidos por el calor suelen ser más apetitosos que las mismas materias primas presentadas en forma mas compacta. El tratamiento químico de los ingredientes ricos en lignina y lignocelulosa ocasiona aumentos sustanciales de aceptación, lo que significa que solo son marginalmente apetecibles en estado natural.

2.8 Uso de aditivos en el ensilaje

A partir de la década de 1990, el uso de aditivos para mejorar las condiciones del proceso de ensilaje comenzó hacerse muy común. Existe un amplio rango donde escoger sustancias como aditivos y actualmente se dispone de un gran número de aditivos químicos y biológicos comerciales adecuados para el ensilaje.

En el ensilaje de trigo se han usado aditivos tanto químicos como biológicos. Un aditivo químico basado en sulfatos, que inhibe el desarrollo de levaduras y mohos, se le atribuye la reducción de pérdidas y mejora de la estabilidad aeróbica. También suele aplicarse sal gruesa corriente sobre el tope del silo trinchera (3 - 4 kg /m²) para proteger esta parte susceptible de hongos. El amoníaco anhidro ha sido empleado también en ensilajes de maíz, trigo y sorgo y con ello mejoró la estabilidad aeróbica, aumentó el contenido en NNP pero como su uso implica riesgos prácticamente no se le emplea (Ashbell et al., 1995).

El Programa UKASTA para Certificación de Forrajes del Reino Unido presenta una lista incluyendo más de 80 productos (Rider, 1997). Afortunadamente, es relativamente simple elegir el aditivo apropiado puesto que el modo de actuar de la mayoría de está comprendido en pocas categorías (**Cuadro 2**).

Entre aditivos de la misma categoría se manifiestan diferencias tales como la efectividad general, la adecuación para determinado tipo de forraje, y la facilidad para su manejo y aplicación. Estos factores, junto al precio y la disponibilidad, determinan cual es el aditivo más conveniente para un ensilaje específico. Evangelista y Ortega (2006), evaluaron el efecto de la adición de lactosuero en distintas concentraciones (0, 25, 50 y 75mL/Kg) en la calidad del ensilado de planta entera de maíz bajo condiciones de laboratorio durante 120 días con monitoreo a los 60, 90 y 120 días. Concluyeron que la adición de lactosuero (25, 50 y 75 mL/Kg) no modifica las características químicas del ensilado después de 120 días de incubación; pero con la adición de lactosuero y 60 días de incubación se obtiene un material de buena calidad.

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, pero suelen ser caros. Además su eficacia es menor puesto que depende del estado de actividad de organismos vivos. El empleo de inoculantes bacterianos que incluían bacterias homofermentativas BAL no mostró buenos resultados en el ensilaje de trigo; los ensilajes tratados con ellas tendieron a deteriorarse más rápido que los

ensilajes usados como control y a favorecer el desarrollo de levaduras y mohos (Weinberg y Muck, 1996). Se sugirió que la producción de AGV, que inhibe el desarrollo de levaduras y mohos, era insuficiente. Al incluir cepas especiales de ciertas bacterias este problema fue aliviado.

La calidad del almacenaje de los aditivos biológicos por parte de fabricantes, vendedores y el propio agricultor es un elemento fundamental. Pese a estas exigencias, tanto en Europa como en los E.U., los inoculantes con bacterias se han convertido en el tipo más frecuente de aditivo empleado en ensilajes de maíz, gramíneas y leguminosas que puedan secarse a una marchitez mayor a 300 g MS/kg (Bolsen y Heidker, 1995; Pahlow y Honig, 1986; Bolsen *et al.*, 1995; Kung, 1996; Weinberg y Muck, 1996).

En Holanda, el uso de inoculantes con bacterias ha aumentado, porcentualmente y en términos absolutos, entre 1995 y 1998; en 1998, 13.7% de todo el ensilaje de gramíneas se ensilaba con algún aditivo, entre los cuales el 31% usaba este tipo de inoculantes, 37% usaban melaza y 29% usaban inhibidores de la fermentación (Honing y Woolford, 1980).

Cuadro 2. Categorías de aditivos para el ensilaje.

Clase	Características	Modo de acción	Ejemplos
Acidificantes	Ácidos orgánicos Ácidos inorgánicos	Disminuir el pH del material ensilado a niveles de 4.0 o menos, produce plasmolisis celular y disminución en la actividad de bacterias proteolíticas.	Acido sulfúrico y clorhídrico, ácido formico, ácido láctico.

Inhibidores de la fermentación	Acción directa Acción indirecta	Inhiben el desarrollo de bacterias lácticas debido a su alto contenido de carbohidratos solubles.	Formaldehído, formalina, hexamina y paraformaldehído.
Estimulantes de fermentación láctica	Sustratos	Estimulan el desarrollo de bacterias lácticas debido a su alto contenido de carbohidratos solubles.	Melaza, suero de leche.
	Enzimas	Degradan carbohidratos estructurales o de reserva, aumentando la disponibilidad de carbohidratos de fácil fermentación.	Celulolíticas y amilolíticas.
	Inóculos bacterianos	Favorecen la dominancia de bacterias ácido lácticas en la microflora del ensilaje.	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. curvatus</i>
Bacterias o bacteriostáticos	Antibióticos	Disminuyen el crecimiento de microorganismos	Bacitracina

		no deseables como clostridios	
Nutritivos	Energéticos proteínicos	Mejoran el valor nutricional de un ensilado.	Cereales, melaza, urea, excretas animales

Fuente: Modificado por McDonald *et al.*, (1991)

A grandes rasgos, todos los aditivos comerciales pueden clasificarse en cuatro grupos principales, según su modo de acción: estimulantes de la fermentación, inhibidores de la fermentación, inhibidores del deterioro aeróbico y absorbentes.

La aplicación de técnicas apropiadas durante la cosecha y el ensilado no son suficientes para impedir que la fermentación inicial del ensilaje (Fase 2) se realice en forma inadecuada. Esto puede ocurrir por una presencia escasa de microorganismos BAL apropiados o por una baja concentración de carbohidratos hidrosolubles, o ambos.

La cantidad de carbohidratos hidrosolubles que se precisa para inducir una buena fermentación depende del contenido de materia seca y de la capacidad tampón del forraje.

Los forrajes que contienen cantidades insuficientes de sustrato para fermentar o un bajo contenido de materia seca arrojan un valor de coeficiente de fermentación (CF) menor a 35. En tales condiciones, para inducir una buena fermentación es preciso aumentar el contenido de azúcares, ya sea agregándolos directamente (p. ej. usando melaza) o introduciendo enzimas que puedan liberar otro tipo de azúcares presentes en el forraje. Los forrajes con valores de CF de 35 o más, tienen suficiente sustrato disponible para una buena fermentación. Sin embargo, agregando ciertas BAL se puede acelerar y mejorar el proceso del ensilaje. En casos de ensilajes con alto contenido de materia seca y poca disponibilidad de agua, la presencia de BAL que sea tolerante a la presión osmótica pasa a ser el factor crítico para una buena fermentación.

Debe recordarse que este tipo de bacteria representa una porción muy pequeña de la microflora natural de los cultivos forrajeros (Pahlow y Honing, 1996). Los forrajes que contengan más de 50% de materia seca se consideran muy difíciles de ensilar (Staudacher *et al.*, 1999).

2.8.1 Aditivos para inhibir la fermentación del ensilaje

Este tipo de aditivos podrían, en teoría, usarse para todo tipo de forraje. Pero, en la práctica se usan generalmente sólo para cultivos con bajo contenido de carbohidratos hidrosolubles (CHOS) y/o alta capacidad tampón (McDonald *et al.*, 1991). En Holanda, los inhibidores más difundidos son diversas sales (Haresing y Cole, 1988). Una ventaja del uso de estas sales es la mayor facilidad y seguridad en su manipulación comparadas con los correspondientes ácidos.

Los aditivos que inhiben la fermentación en el ensilaje pueden reducir la cantidad de esporas de clostridios. Empleados en ensilaje de forraje marchito de gramíneas, se ha constatado una disminución de esporas de cinco a 20 veces. Resultados similares pueden lograrse también al agregar melaza, como un estimulante de la fermentación. Los aditivos más efectivos para inhibir el desarrollo de clostridios parecen ser aquellos relacionados con el ácido fórmico, el hexametileno y los nitritos (Jonsson *et al.*, 1990).

2.8.2 Aditivos que inhiben el proceso de deterioro aeróbico

Es obvio que para impedir el deterioro aeróbico será preciso inhibir la actividad y desarrollo de los microorganismos responsables de este deterioro, y muy especialmente de aquellos que dan comienzo a este proceso (p. ej. levaduras y bacterias que generan una fermentación acética). Algunos aditivos útiles para este propósito incluyen varios ácidos grasos volátiles, como el propiónico y el acético, y otros de tipo biológico, provenientes de microorganismos como lactobacilos y bacilos que son capaces de producir bacteriocinas (Woolford, 1975a; McDonald *et al.*, 1991; Moran *et al.*, 1993; Weinberg y Muck, 1996).

Los ácidos sórbico y benzoico también muestran una fuerte actividad antibiótica (Woolford, 1975b; McDonald *et al.*, 1991). Recientemente se ha descubierto que *Lactobacillus buchneri* es un inhibidor muy eficaz del proceso de deterioro aeróbico. Esto parece explicarse principalmente por la capacidad de *L. buchneri* para degradar, bajo condiciones anaeróbicas, el ácido láctico en ácido acético y 1,2-propanodiol, lo cual causa a su vez una disminución muy significativa del número de levaduras presentes (Driehuis *et al.*, 1997; Oude Elferink *et al.*, 1999). Este resultado concuerda con el hecho que los ácidos grasos volátiles, como propiónico y acético, son mejores inhibidores de levaduras que el ácido láctico, y que mezclas de ácidos láctico y propiónico o acético muestran efectos sinérgicos en su poder inhibidor (Moon, 1983).

Los resultados de Moon (1983) también explican porque en muchos casos, los inoculantes biológicos que promueven la fermentación láctica homofermentativa no mejoran la estabilidad aeróbica, y pueden incluso disminuirla (Weinberg y Muck, 1996; Oude Elferink *et al.*, 1999).

La inoculación de bacterias que producen propionatos no parece ser apropiado para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilaje. Esto se debe al hecho que este tipo de bacterias sólo puede proliferar y producir propionato siempre que el nivel del pH en el ensilaje permanezca relativamente alto (Weinberg y Muck, 1996).

2.8.3 Aditivos usados como nutrientes o como absorbentes

Ciertos cultivos muestran deficiencias en algunos componentes nutritivos esenciales para una buena dieta para rumiantes. Al suplir los elementos deficitarios con un aditivo en el momento de ensilar se mejora el valor nutritivo del forraje. Los aditivos empleados con este propósito incluyen el amoníaco y la urea que permiten aumentar el contenido en proteína, bruta y verdadera, del ensilaje, y la cal y el $MgSO_4$ que aumentan el contenido de calcio y magnesio. Si bien estos últimos aditivos no tienen efecto benéfico alguno en la fermentación, la urea y el amoníaco pueden mejorar la estabilidad aeróbica del ensilaje (McDonald *et al.*, 1991).

Los absorbentes son empleados para forrajes con bajo contenido en materia seca para evitar pérdidas de nutrientes provocadas por un escurrimiento excesivo del ensilaje. La pulpa seca de remolacha azucarera y la pulpa de cítricos han dado buenos resultados. El uso de paja también es útil pero tiene el efecto negativo de bajar el tenor nutritivo del ensilaje (McDonald *et al.*, 1991).

2.8.4 Combinaciones de aditivos

La mayoría de los aditivos comerciales contienen más de un ingrediente activo con lo cual se logra incrementar la eficacia y abarcar un rango más amplio de funciones. Algunas combinaciones muy usadas incluyen inoculantes que estimulan la fermentación láctica homofermentativa junto con enzimas que permiten liberar ciertos azúcares, o combinaciones que permiten la fermentación y deterioro de sustancias inhibitoras como el ácido fórmico, sulfitos y ácido propiónico (Rider, 1997). Montes (2002), estudió el efecto de bacterias ácido lácticas y enzimas en diferentes concentraciones sobre las características físico-químicas del ensilado de maíz y concluyó que no causa ningún efecto en el contenido de proteína, humedad, cenizas, tampoco en el contenido de ácido láctico, sin embargo para fibra cruda el mejor tratamiento fue el 200% porque generó una disminución en el contenido por efecto de las enzimas, propiciando así una mejor digestibilidad del ensilado.

Se han empleado enzimas que degradan la pared celular como las celulasas, hemicelulasas y pectinasas. El aporte positivo de su acción es la degradación de carbohidratos complejos transformándolos en azúcares fermentativos mejorando la digestibilidad ruminal. Se ha comprobado que estas enzimas pueden reducir el contenido de fibra y aumentar su digestibilidad sólo en ensilajes hechos con trigo húmedo ensilado al momento de la floración, pero no en ensilajes de trigo más maduro y seco (Weinberg y Muck, 1996).

Actualmente se trabaja en la obtención de nuevos aditivos que disminuyen el efecto negativo de la fermentación láctica homofermentativa sobre la estabilidad aeróbica. Ya se han obtenido resultados promisorios que combinan productos homofermentativos y heterofermentativos facultativos del grupo BAL con reactivos

como el amoníaco y el benzoato de sodio, o combinando BAL heterofermentativos facultativos con *L. buchneri* heterofermentativo obligado.

2.8.5 Lactosuero como aditivo en el ensilaje

El lactosuero es un líquido que se obtiene por la coagulación de la leche durante elaboración del queso, una vez que se separa de la caseína y la grasa (Spreer 1991). Este líquido constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de sus compuestos que son solubles en agua. La composición química del suero varía dependiendo de las características de la leche y las condiciones de elaboración del queso. Su pH oscila entre 6.5-6.7, con un ideal de 6.6. **(Cuadro 3)**.

El agua es el componente más abundante en el suero, constituye el 93% o más de este. La lactosa se encuentra en una proporción cercana al 5%. Un poco menos del 1% del suero lo constituye compuestos nitrogenados, de las cuales la mitad son proteínas de muy alto valor nutritivo, entre las que se pueden encontrar las albúminas, globulinas y una fracción llamada proteasa-peptona. Otros compuestos del suero son los minerales que se encuentran en concentraciones de alrededor de 0.7%, se encuentra en mayor cantidad sodio, potasio, magnesio, cloruro y fosfato. El suero contiene además las vitaminas hidrosolubles de la leche, de las cuales la más importante es la riboflavina o vitamina B₂ y en cantidades muy variables aparecen grasa y ácido láctico.

Cuadro 3. Composición media del suero lácteo (Spreer, 1991)

Parámetro	Suero dulce	Suero ácido
Agua	93-95%	93-95%
Extracto seco	5-7%	5-7%
Lactosa	4.5-5.3%	3.8-5.2%
Proteínas	0.6-1.1%	0.2-1.1%
Grasa	0.1-0.4%	0.1-0.5%
Sales Minerales	0.5-0.7%	0.5-1.2%
Ácido Láctico	0.1-0.2%	0.2-1.2%
Cloruros	0.15-0.6%	0.16-0.6%
Finos	0.05-0.3%	0.05-0.3%
Valor de pH	6.45	5

El lactosuero puede ser usado por distintos fines como los siguientes:

1. Como sustrato principal para el desarrollo de fermentaciones (Canales *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2002).
2. Forraje para ganado porcino y bovino (Jean, J. 1971).
3. Formulación de bebidas para consumo humano (Jean, J. 1971).
4. Concentración del lactosuero completo (Jean, J. 1971).
5. Fuente de una serie de componentes aislados a través de su fraccionamiento (proteínas y lactosa) (Muller *et al.*, 1999).

El lactosuero es un excelente medio de cultivo, cuya principal fuente de carbono es la lactosa, sin embargo, su uso no se limita a fermentaciones en los que se usen microorganismos capaces de metabolizar este azúcar. La lactosa se puede transformar en glucosa y galactosa, o mediante una primera fermentación, transformarla en ácido láctico, y en una segunda, utilizar el metabolismo como fuente de carbono. Entre los productos que se obtienen, o pueden ser obtenidos por fermentación del lactosuero, se encuentran: bacterias lácticas y otros microorganismos usados en las propias queserías; ácido láctico, alcohol, ácido acético, ácido propiónico; enzimas como proteasas y pectinasas;

penicilina, vitaminas B₂ y B₁₂, aceite y proteína unicelular para alimento humano y de animales (Hayashi, 1990).

Paradójicamente el lactosuero es uno de los materiales mas contaminantes que existen en la industria alimentaría. Cada 1,000 L de lactosuero generan cerca de 35kg de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y cerca de 68kg de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas (Jelen, 1979).

Más aún, no usar el lactosuero como alimento es un enorme desperdicio de nutrimentos; el lactosuero contiene un poco más de 25% de las proteínas de la leche, cerca del 8% de la materia seca y cerca del 95% de la lactosa. Como se mostró anteriormente, por lo menos el 50% en peso de los nutrimentos de la leche se quedan en el lactosuero.

Ahora bien, no todos los lactosueros son iguales. Una de las diferencias principales entre ellos es su composición, que depende no solamente de la composición de la leche para quesería y del contenido de humedad del queso, sino de manera muy significativa, del pH al que el lactosuero se separa de la cuajada.

III. HIPÓTESIS

Hipótesis

Cuando se agrega Lactosuero al ensilaje de desechos de hongos comestibles, incrementa la digestibilidad *in situ*.

- **OBJETIVOS**

Objetivo general

Determinar la digestibilidad *in situ* en una vaca fistulada de ensilaje de paja de trigo con micelio de *Pleurotus* spp. Con diferentes concentraciones de lactosuero ácido.

Objetivos particulares

Comparar la digestibilidad *in situ* de los diferentes tratamientos de ensilado de paja con micelio de *Pleurotus* spp, adicionado con diferentes concentraciones de lactosuero.

Realizar análisis para determinar la cantidad de químicos proximales durante el proceso de ensilaje.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del Experimento

La fase experimental se realizó en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en el laboratorio de Aprovechamiento Agroalimentario Integral iniciando con la apertura de los silos y aplicación de digestibilidad *in situ* en el mes de Agosto del 2006.

5.2 Diseño de los experimentos

Se elaboraron cinco tratamientos, los cuales consistieron en utilizar paja de desecho de hongos (*Pleurotus* spp.) con cinco concentraciones de lactosuero (0, 12.5, 25, 50 y 100%), las cuales se realizaron como se muestra en el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Concentraciones de lactosuero empleados como aditivo en los diferentes tratamientos.

Concentración	Lactosuero (mL)	Solución en agua (mL)
0%	0	200
12.5%	25	175
25%	50	150
50%	100	100
100%	200	0

5.3 Proceso quirúrgico para el estudio de la digestibilidad *in situ*

La elaboración de una fístula en el rumen del ganado bovino, ovino y caprino es un procedimiento realizado por personal con conocimientos en el área de Medicina Veterinaria (**Fig. 3**), esta operación quirúrgica permite tomar muestras del

contenido del rumen y hacer infusiones de sustancias en cantidades conocidas y a razones también conocidas dentro del rumen, con la ventaja de tener libre acceso al rumen mediante la fístula ruminal.



Figura 3. Operación quirúrgica de fístula ruminal

5.4 Elaboración de microsilos

Se tomó desecho de paja de hongos comestibles (*Pleurotus spp*), con una humedad del 66-68%. Los microsilos se realizaron en frascos de vidrio con una capacidad aproximada de 5 kg, un microsilo por cada concentración dando un total de cinco microsilos; estos frascos fueron lavados y sanitizados para evitar contaminaciones, además de ser etiquetados para su control (**Fig. 4**).



Figura 4. Microsilos con 0, 12.5, 25, 50 y 100% de lactosuero, representados por los números 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

La paja fue picada en trozos aproximadamente de 2cm de longitud, se introdujo en los frascos mezclándola homogéneamente con el lactosuero logrando así agotar el lactosuero y la paja al mismo tiempo, después se comprimió a presión manual para expulsar la mayor cantidad de aire, repitiendo el procedimiento con cada una de las concentraciones (0, 12.5, 25, 50 y 100%) de lactosuero.

Al final del llenado de cada microsilo, se cerró herméticamente para evitar una fermentación aeróbica, posteriormente se incubó a 30° C por 90 días. Se procedió a destapar cada microsilo a los 45 días en dos ocasiones después de haber iniciado el proceso de fermentación.

5.5 Obtención de las muestras para su Análisis

Se destaparon los microsilos de cada concentración, descartando la parte superior del ensilado (5cm), se mezcló uniformemente todo el material dividiéndolo en 2 partes, desechando una parte, se tomaron aproximadamente 200g de cada muestra que fueron almacenadas en bolsas de nylon, las cuales se identificaron y se conservaron en congelación. Para iniciar los análisis de laboratorio, se descongeló previamente la cantidad de muestra que se utilizara para cada análisis.

5.6 Variables de Estudio

5.6.1 Extracciones

Se realizaron los extractos mediante la técnica de Campos (2000). Se tomaron 10 g de materia del microsilo, posteriormente se le adicionaron 100 mL de agua destilada y se mantuvo agitando durante una hora. Pasado este tiempo se filtró con una gasa y posteriormente en una bomba de vacío en papel Whatman No. 41, finalmente se filtró en microfiltros con tamaño de poro de 0.45 µm.

5.6.2 Determinación de pH

pH es definido como el logaritmo negativo de la concentración molar de iones hidrogeno (Susane, 2003).

Para determinarlo se tomaron 50 mL de la extracción del material ensilado y se depositaron en un vaso de precipitado, posteriormente se calibró el potenciómetro con soluciones buffer de 4 y 7, se introdujo el electrodo en el vaso y se tomó la medición.

5.6.3 Determinación de humedad

Principio

El fundamento de esta técnica se basa en la aplicación de calor a la muestra que contiene humedad superficial e interna. Lo anterior se logra mediante el calentamiento y circulación continua de aire seco, lo que permite la evaporación de agua presente y así lograr el secado de la muestra.

Técnica

Se pesaron 10g de muestra del material ensilado de cada uno de los microsilos, se colocaron en charolas de aluminio previamente puestas a peso constante, se introdujo a la estufa a una temperatura de 95 – 100° C por un periodo de ocho horas. Se enfrió en un desecador y se pesó en la balanza analítica, se realizaron los siguientes cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = (A-B) / pm * 100$$

Donde:

A = Peso de la cápsula de aluminio con la muestra húmeda

B = Peso de la cápsula de aluminio con la muestra seca

pm = Peso de la muestra húmeda

5.6.4 Determinación de cenizas

Principio

Es llamado así al residuo que resulta de la combustión completa de una muestra dada a una temperatura constante (500-600°C), hasta el agotamiento total del material combustible (Susane, 2003).

Técnica

Se pesaron 0.5g de muestra seca del material ensilado, en un crisol a peso constante, previamente pesado y tarado, se carbonizó el material en un mechero hasta que no desprendió humo, posteriormente se introdujo en una mufla previamente calentada a 550° C por un periodo de cinco horas o hasta que tomo un color blanco, se enfrió en un desecador y se pesó en una balanza analítica. Posteriormente se realizaron los siguientes cálculos:

$$\% \text{ cenizas} = (A-B) / pm * 100$$

Donde:

A = Peso del crisol con cenizas

B = Peso del crisol

pm = Peso de la muestra

5.6.5 Determinación de proteína cruda

Principio

El método Kjendahl para la determinación de proteína-nitrógeno consiste en la conversión de proteína-nitrógeno a sulfato ácido de amonio durante la digestión del resto de la materia orgánica con ácido sulfúrico y calor, en presencia de un catalizador. Una vez que la materia orgánica se ha desintegrado completamente, la solución se neutraliza con hidróxido de sodio, liberándose amoniaco el cual es destilado con vapor dentro de una solución de ácido bórico, para formar un complejo boro-amoniaco. La cuantificación del nitrógeno se logra cuando una

solución de ácido previamente valorado (ácido clorhídrico 0.1 N) se añade a la solución formando por cada equivalente de boro-amoniaco, un equivalente de cloruro de amonio. Aquí, 1mL de ácido estandarizado neutraliza 0.014g de nitrógeno en forma de amonio (AOAC, 1975).

Técnica

Se analizó 0.5 g de muestra del material del ensilado seco, que se colocó junto con 5g de mezcla digestora (200g de sulfato de potasio, 20g de sulfato cúprico pentahidratado y 5g de dióxido de selenio) en una probeta Kjendahl, se añadió 15mL de ácido sulfúrico concentrado y se mezclaron. Se realizó el proceso de digestión por calentamiento hasta alcanzar una coloración verde transparente, a partir de este momento se continuó el calentamiento por 30 minutos más. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió 20mL de agua destilada, posteriormente se adiciono automáticamente 50 mL de hidróxido de sodio al 40%. Esta mezcla se sometió a una destilación hasta obtener 300mL de destilado en un matraz Erlenmeyer que ya contenía 50 mL de ácido bórico al 20% y dos gotas de indicador (rojo de metilo). Finalmente se valoró el destilado con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N y se realizaron los cálculos correspondientes utilizando el factor de conversión de 6.25.

$$\% \text{ de proteína cruda} = ((\text{ml B} - \text{ml de ácido}) (\text{N ácido}) (104))/\text{pm} * 6.25$$

Donde:

MI B = ml de ácido gastados en el testigo.

N = Normalidad del ácido.

1.4 = Miliequivalentes de NaOH.

pm = peso de la muestra.

6.25 = Factor de conversión de nitrógeno a proteína cruda.

5.6.6 Determinación de Fibra Detergente Neutro (FDN)

Principio

El método de detergente neutro es un método rápido para la determinación de fibra en alimentos de origen vegetal. Parece dividir la materia seca de los alimentos muy cerca al punto que separa los constituyentes solubles y nutricionalmente disponibles de aquellos que son aprovechables de manera incompleta y dependen de la fermentación microbiana (Van Soest, 1973).

Técnica

Se pesó 1g de muestra seca-molida y se preparó una solución de detergente neutro (18.61g de EDTA y 6.81g de Tetraborato de Sodio, 30g de Lauril sulfato de sodio, 10mL de Etilen Glicol Monoetil éter y 4.56g de Fosfato Ácido Disódico para un litro de agua destilada). Posteriormente se colocó la muestra y 100 mL de la solución detergente neutro en un vaso de Berzelius apropiado para el aparato de fibra (Labconco) y se procedió a calentar la solución hasta hervir dejándose por 60 minutos evitando la formación de espuma. Después se procedió lavar la muestra con agua caliente en un Sistema de Filtración de Fibra (modulo de Extracción), hasta retirar la mayor cantidad de detergente, luego se llevaron los contenedores de la muestra a secar a 100° C en una estufa, después se realizaron los cálculos correspondientes.

$$\% \text{ FDN} = (A - B) / \text{pm} * 100$$

A = peso vaso y muestra después de realizar la hidrólisis.

B = peso constante del vaso con cilite.

pm = peso de la muestra.

5.6.7 Digestibilidad *in situ*

Principio

El método de digestibilidad *in situ* se basa en la solubilidad de los alimentos al ingresar al tracto digestivo de los rumiantes, ya que se ha comprobado que los procedimientos de fermentación en el rumen son muy útiles para las investigaciones de alimentos o para obtener sus características.

Las investigaciones se realizan con ayuda de una técnica quirúrgica llamada fístula ruminal hecha al ganado caprino, ovino o bovino, es un procedimiento bastante frecuente que permite tomar muestras del contenido del rumen y hacer infusiones de sustancias conocidas y a razones también conocidas dentro del rumen.

Técnica

La técnica consiste en colocar 10g de materia seca (100 – 105 °C por un periodo de 12 h), en una bolsa de nylon de (u otro material indigerible y con tamaño de poro de 0.30 µm para impedir la salida de materia estudio), la cual se coloca en el rumen atada a una cadena para evitar al dispersión de éstas dentro del rumen del animal. Las bolsas se retiran del rumen después de 48 h cumplidas, se lavan perfectamente hasta retirar la mayor cantidad de liquido ruminal y se someten a un secado a 100 – 105° C por 12 h, posteriormente se realizan los análisis correspondientes.

$$DA = (100) - ((dDA) * (100) / (aDA))$$

Donde:

DA: Digestibilidad Aparente.

dDA: después de Digestibilidad Aparente.

aDA: antes de digestibilidad aparente.

5.6.8 Determinación de extracto etéreo

Principio

Al aplicar calor al éter, éste se volatiliza, posteriormente se condensa por acción de la circulación de agua fría a través de un condensador y al pasar se precipita en forma de lluvia a través de la muestra, arrastrando todo aquel material soluble en éter. Este procedimiento es repetido una y otra vez hasta que todo el material extraíble de la muestra ha sido obtenido (AOAC, 1975).

Técnica

La muestra es deshidratada en un recipiente que soporta temperaturas de 100 a 105° C durante 12 h. Los vasos y cartuchos para el equipo Soxhelt también se mantienen durante 12 h a 100 – 105° C, posteriormente se enfrían en un desecador media hora y se registra su peso, se toma la muestra deshidratada evitando el contacto directo con las manos, se pesan de 2 a 5g en los cartuchos de celulosa.

El reactivo utilizado es éter de petróleo; se coloca la muestra y se vierte la cantidad necesaria en los vasos Soxhelt y se programa, terminando el ciclo programado, los vasos se colocan en una estufa hasta eliminar todo el éter restante, se enfrían y registran pesos.

$$\% \text{ Extracto Etéreo} = (\text{peso del vaso después del ciclo de extracción} - \text{peso constante del vaso}) / \text{peso de muestra} * 100$$

5.6.9 Extracto Libre de Nitrógeno (ELN)

Representa la fracción del alimento realmente digerible.

$$\text{ELN} = (100) - (\text{pc} + \text{g} + \text{FDN} + \text{C})$$

pc= proteína cruda

g= grasa

FDN= Fibra Detergente Neutro

C= cenizas

5.6.10 Análisis estadístico de datos

El análisis de datos fue completamente al azar, con análisis de varianza mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia ($P < 0.05$), en un paquete estadístico llamado NCSS versión 2003.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética del contenido nutricional de ensilados de paja con micelio de *Pleurotus ostreatus* (PO) adicionado con diferentes concentraciones de lactosuero ácido (LA).

Materia seca

Como se observa en la **Fig. 5**, el contenido de materia seca entre los tratamientos se redujo debido a la adición de LA al inicio del ensilado presentando diferencias significativas ($P < 0.05$). Para el tratamiento que posee 0% de LA el contenido de materia seca es de $26.69 \pm 0.27\%$ y para el tratamiento con 100% de LA fue de $23.07 \pm 0.27\%$, estos valores son menores a lo reportado por Alderete (2006) quien menciona que el tratamiento de paja con micelio de *PO* sin LA fluctuó en 37% y en los tratamientos con LA fue de 30%.

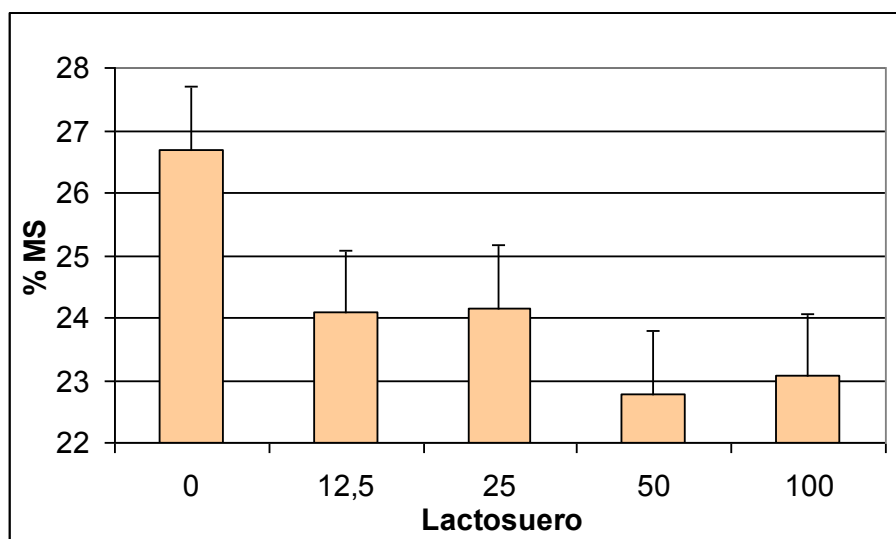


Figura 5. Determinación de materia seca en los tratamientos al inicio del ensilaje. Evangelista y Ortega (2006) reportaron que en los ensilados de maíz adicionados con diferentes concentraciones de lactosuero poseían de 21-30% de materia seca, y atribuyen que los cambios o variaciones en materia seca tiene un efecto directo sobre la cantidad de bacterias, velocidad de fermentación y pérdida de energía debido a la respiración prolongada de la planta.

Alderete (2005), no reporta cambios considerables en el contenido de materia seca, lo anterior pudo ser debido a un mejor ensilaje.

En cuanto al comportamiento del contenido de materia seca con respecto al tiempo, en la **Fig. 6** se puede apreciar una disminución pasando de 24.68 - 26.26+/- 0.27% a los 0 días a 22.06 - 23.51+/-0.47% a los 45 días para los tratamientos con 0 y 50% de LA, con diferencias significativas ($P<0.05$). Considerando que para obtener un ensilado de buena calidad debe de poseer 30% de materia seca y sin variaciones en el transcurso del proceso de ensilaje. A los 90 días el ensilaje de PO presento incremento de materia seca en todos los tratamientos debido a las prácticas de obtención de muestra de los microsilos, con un incremento mas visible en el tratamiento con 0% de LA.

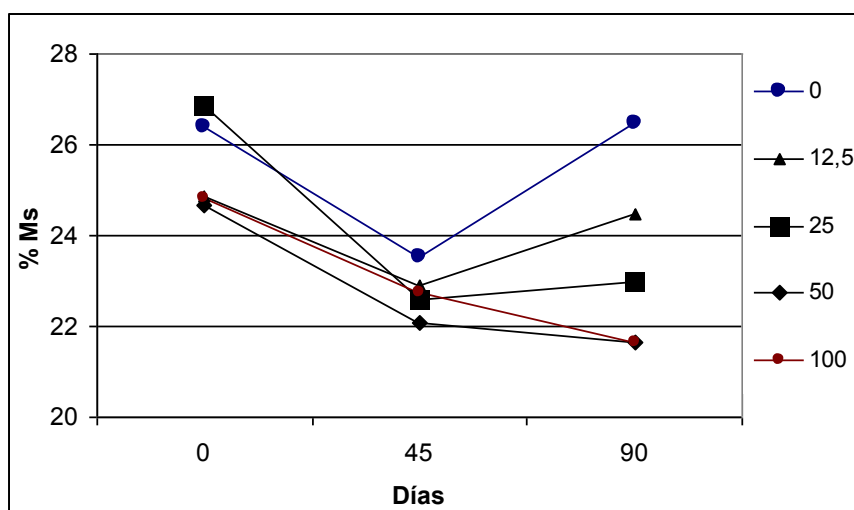


Figura 6. Contenido de materia seca respecto al tiempo de ensilaje.

Fibra Detergente Neutro (FDN)

La determinación de FDN (**Fig. 7**) señala que no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos, con valores entre 63.1 - 63.18+/-0.52% al inicio del proceso de ensilaje (0 días). Alderete, (2005) reportó que no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) con valores de 37.02 - 38.06%. El contenido de FDN es directamente proporcional al estado de madurez y del tipo de cultivo en estudio; así pues Montes (2002) reportó un contenido de FDN para ensilado de maíz de 6.32 -

11.01% y Evangelista y Ortega (2006) reportaron que el arroz posee desde 46.8% hasta 60.2% FDN y en planta entera de maíz de 31% a 41.9%. La diferencia del contenido de FDN es debido básicamente al grado de madurez que presenta el materia ensilado (Paja con micelio de *PO*), proporcional al contenido de celulosa y lignina, elementos usados para la alimentación de rumiantes.

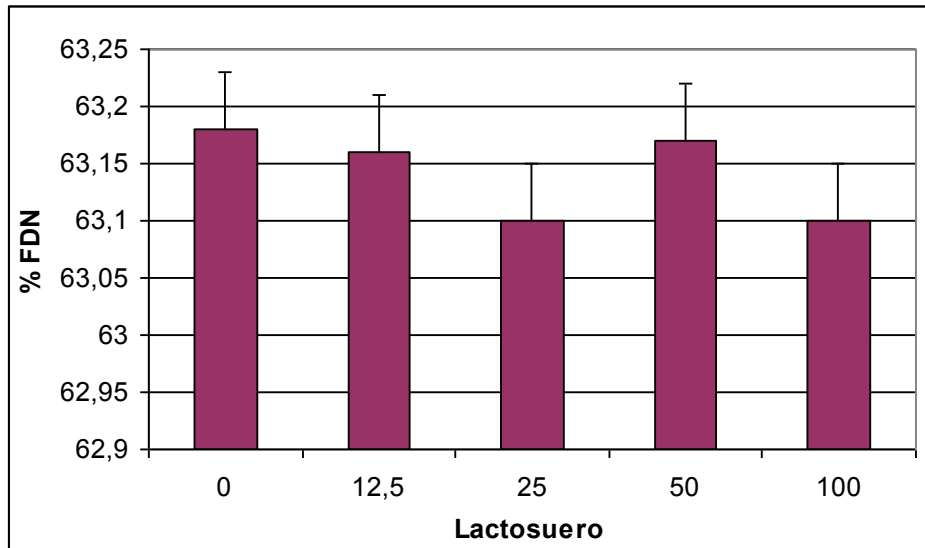


Figura 7. Contenido de FDN al inicio del proceso de ensilaje.

En cuanto al análisis del contenido de FDN respecto al tiempo, hubo diferencias significativas ($P < 0.05$), denotando un incremento de $63.1 - 63.18 \pm 0.52\%$ a los 0 días a $64.49 - 68.46 \pm 0.47\%$ a los 45 días para el tratamiento con 50% de LA (**Fig. 8**). De 45 a 90 días se muestra una disminución de FDN en todos los tratamientos.

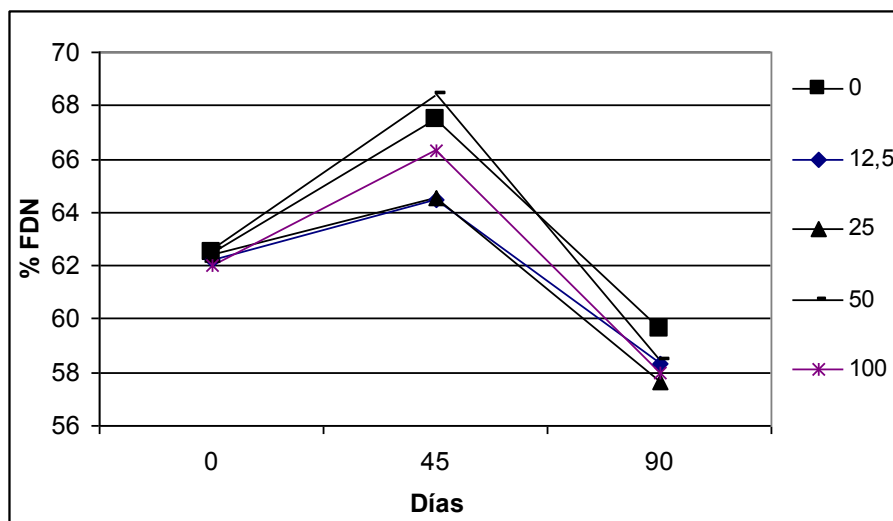


Figura 8. Determinación de FDN en los tratamientos a 0, 45 y 90 días.

Proteína cruda

En el análisis químico de ensilado de paja de *PO* adicionado con diferentes concentraciones de LA (0, 12.5, 25, 50 y 100), se observó que el contenido de proteína se situó entre 5.13 – 5.74+0.14% en todos los tratamientos (**Fig. 9**) al inicio del proceso de ensilaje y no existieron diferencias significativas ($P>0.05$).

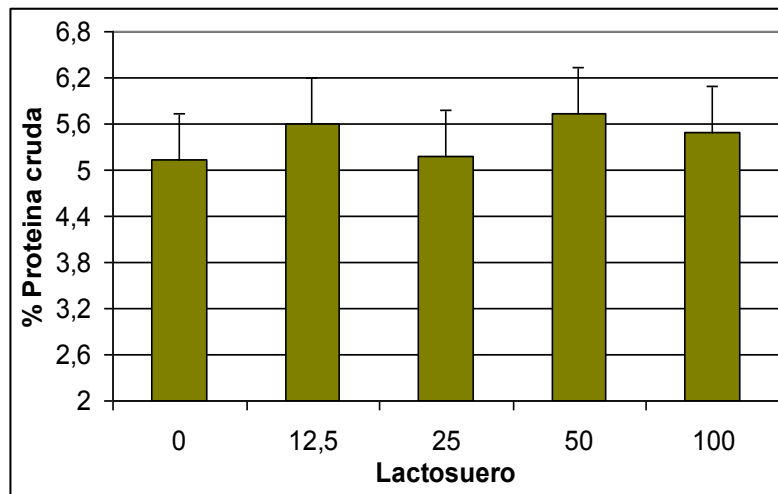


Figura 9. Análisis de proteína de los diferentes tratamientos al inicio del proceso de ensilaje.

Estos resultados son similares a los de Evangelista y Ortega (2006), quienes reportaron que la adición de lactosuero no modifica las características químicas al inicio de ensilados de maíz adicionado con 0, 25, 50 y 75 de lactosuero.

El análisis del comportamiento de los diferentes tratamientos respecto al tiempo (0, 45 y 90), señala que conforme transcurre el tiempo la cantidad de proteína presente se incremento debido a la acción de microorganismos presentes generando proteína microbiana (**Fig. 10**), alcanzando los valores más altos (7.26 – 6.9+0.14%) en los tratamientos que contienen 50 y 100% de LA respectivamente a los 90 días, tal como lo señalan Evangelista y Ortega, 2006 donde encuentran incremento a los 60 días del proceso. De acuerdo al análisis entre tratamientos se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) entre los tratamientos, tal como lo señala Montes (2002) en donde los microsilos de maíz adicionados con un cultivo comercial de una mezcla de bacterias ácido lácticas y enzimas en concentraciones

recomendadas por el distribuidor, existe diferencia significativa ($P < 0.05$) en cuanto al contenido de proteína desde 5.26 – 7.23% durante el proceso de ensilaje.

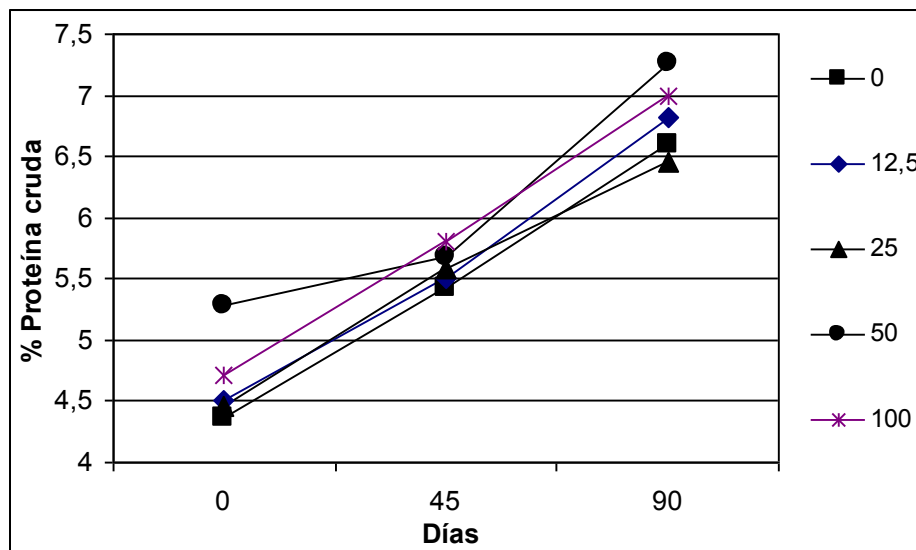


Figura 10. Contenido de proteína en a 0, 45 y 90 días de proceso de ensilaje.

Extracto Libre de Nitrógeno (ELN)

En la **Fig. 11** se observa que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos en el contenido de ELN al inicio del ensilaje, con valores de 16.7 a 17.84 \pm 0.44% en los tratamientos que contienen 0 % de LA y 100% de LA, respectivamente. Los valores son diferentes a lo que reportó Alderete (2006), con valores que van desde 20 – 44%.

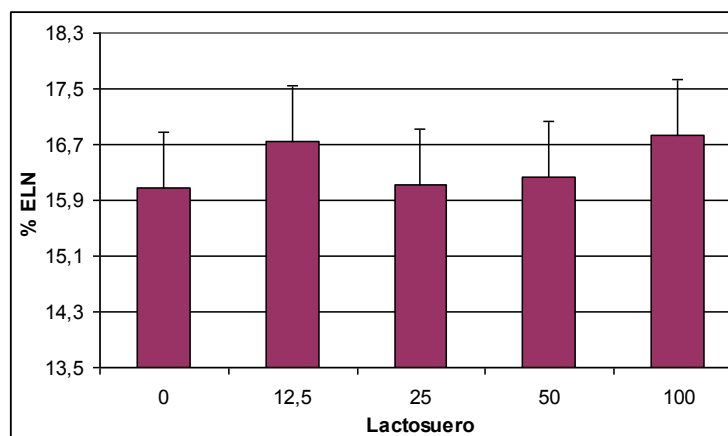


Figura 11. Contenido de ELN al inicio del proceso de ensilaje.

La diferencia del contenido de ELN con lo reportado por Alderete (2006) es debido a que en esta investigación, el contenido de FDN y cenizas son los que encabezan el mayor contenido. Los tratamientos que contienen 12.5 y 100% de LA poseen 17.75 y 16.84 respectivamente.

El comportamiento del contenido de ELN respecto al tiempo (**Fig. 12**), existieron cambios a los 45 y 90 días con diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos. El comportamiento en el contenido de ELN durante el proceso de ensilaje, es provocado por el comportamiento del contenido de FDN durante el proceso de ensilaje, ya que de 0 a 45 días se aprecia un comportamiento descendente y de 45 a 90 días presenta un comportamiento creciente.

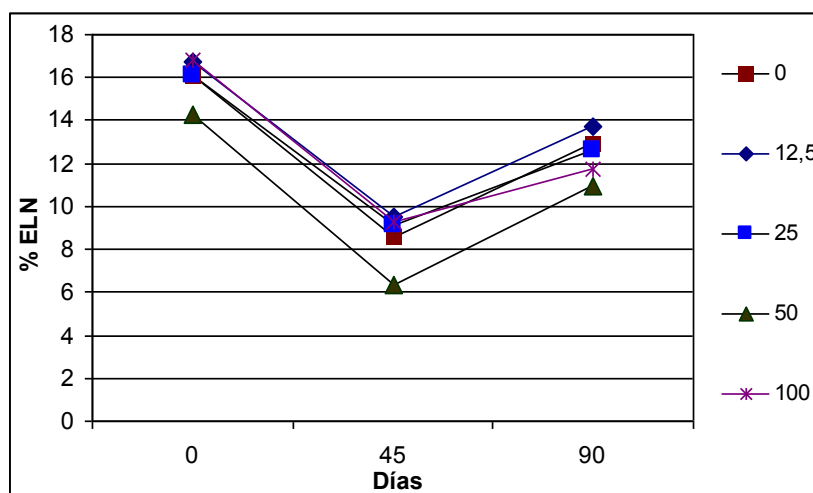


Figura 12. Contenido de ELN durante el proceso de ensilaje.

pH

En el **Cuadro 5** se observan los valores de pH durante el proceso de ensilaje. A los 0 días el material a ensilar muestran un pH aceptable, similares a los reportados por Alderete, (2005). Pero pasados los días de ensilaje el pH se incremento hasta alcanzar valores entre 8 y 9, diferentes completamente con los ideales de un ensilado de buena calidad 3.4 – 3.8 (Alderete, 2005).

Cuadro 5. Comportamiento del pH durante el proceso de ensilaje.

Tratamiento	0 días	45 días	90 días
0	6,88	8,55	8,56
12.5	6,43	8,77	8,88
25	6,37	8,69	8,97
50	6,71	8,62	8,62
100	6,75	9,04	8,81

Montes (2002), reportó que el bajo contenido base de materia seca afecta negativamente el proceso de fermentación dando lugar a un pH alto y atribuye los cambios de pH a la capacidad buffer del material a ensilar. En esta investigación el pH inicial se situó entre 6.3 y 6.8 a los 0 días, pero a los 45 días, el pH al igual que la Humedad relativa presentó un incremento llegando a un pH de 8 manteniéndose así hasta los 90 días, sin ningún indicio de disminuir, lo anterior puede ser debido al contenido de Humedad relativa dentro del microsilo.

Cenizas

Al inicio del proceso de ensilaje no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos con un contenido cenizas promedio de 16.54%. Pero conforme transcurre el tiempo (0, 45 y 90 días) se observa que hay un incremento de 44% a los 90 días (**Fig. 13**) en todos los tratamientos. Alderete (2005) y Montes (2002), también reportan incrementos en el contenido de cenizas respecto al tiempo y lo atribuyen a la mineralización de compuestos orgánicos durante el proceso de fermentación.

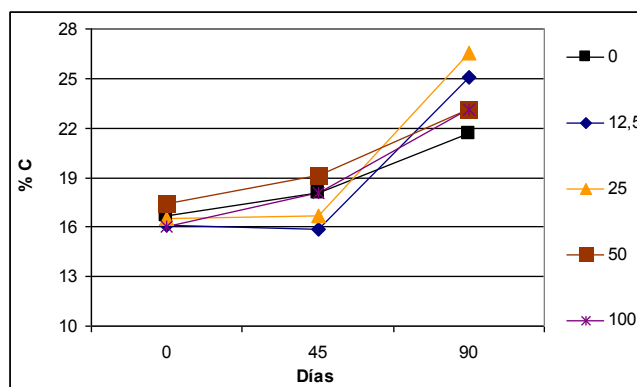


Figura 13. Contenido de cenizas en los tratamientos respecto al tiempo.

Grasa

En el contenido de grasa en los tratamientos no hubo diferencias significativas ($P>0.05$), situando los valores ($0.37 - 0.5 \pm 0.02\%$) al inicio del ensilaje, al igual como lo reporta Alderete (2005).

El comportamiento de los diferentes tratamientos respecto al tiempo señalan que se redujo a los 90 días sin diferencias significativas ($P>0.05$). Las cantidades determinadas en los ensilados son mínimas, por lo que se puede decir que el contenido de grasa es despreciable (**Fig. 14**). La disminución del contenido de grasa puede ser debido al detrimento nutricional del ensilado.

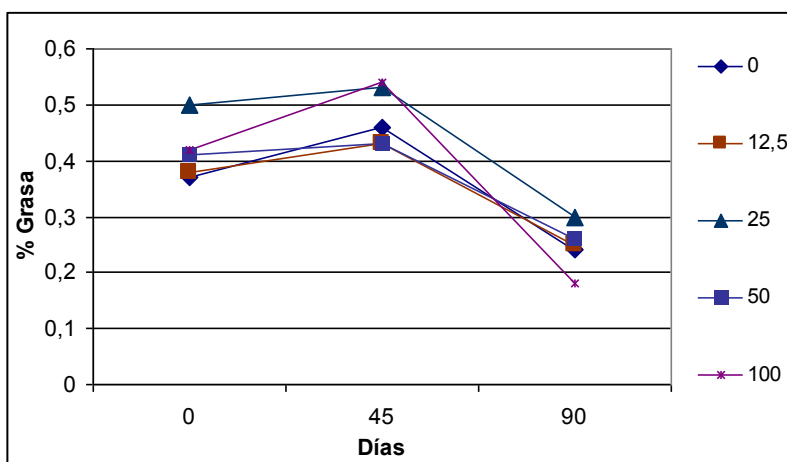


Figura 14. Promedio del contenido de grasa en los tratamientos (0, 12.5, 25, 50 y 100) respecto al tiempo.

Digestibilidad del contenido nutricional de ensilados de paja con micelio de *Pleurotus ostreatus* (PO) adicionado con diferentes concentraciones de lactosuero ácido (LA).

Digestibilidad de Materia seca

La digestibilidad de materia seca (**Fig. 15**) se situó entre $36.23 - 37.39 \pm 0.38\%$, al inicio del proceso ensilaje sin diferencias significativas ($P>0.05$), diferente a lo reportado por Mustafa, (2004), quien señala que la digestibilidad de materia seca de microsilos de granos de maíz dulce es de 52%. Las diferencias de la

digestibilidad de materia seca entre los microsilos de maíz y la paja de *PO*, se deben a que la paja ha sido usada para el cultivo de *PO*, por lo tanto presenta cierto grado de agotamiento de nutrientes; en cambio el material usado por Mustafa, (2004) ha sido destinado únicamente para ensilar, es decir no presentar ningún tipo de agotamiento nutrimental.

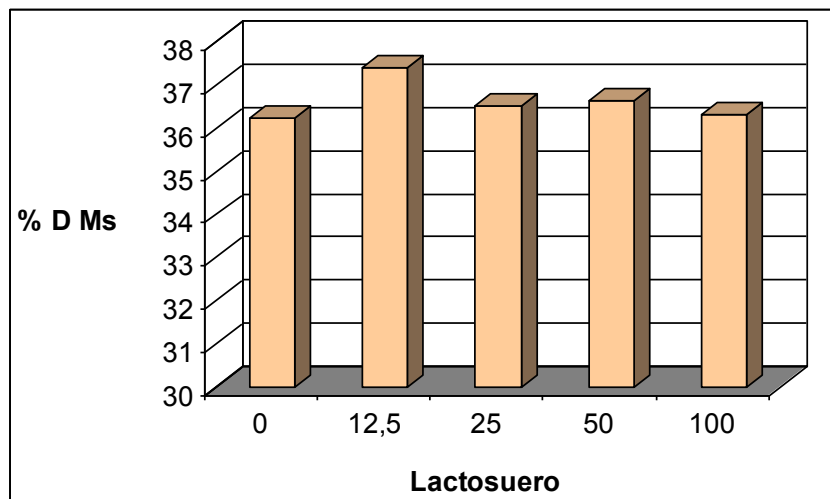


Figura 15. Digestibilidad *in situ* de Materia seca en silos al inicio del proceso de ensilaje.

La digestibilidad de materia seca durante el proceso de ensilaje encontrando una mayor digestibilidad al inicio (37.5) y menor a los 90 días de ensilaje (35%). Las variaciones son debidas a los cambios en el contenido de materia seca que presenta durante el proceso de ensilaje, así el contenido de materia seca ejerce un efecto directo sobre la digestibilidad de la misma, cuando aumenta el contenido de materia seca también su digestibilidad y viceversa.

Digestibilidad de Fibra Detergente Neutro (FDN)

El comportamiento de la digestibilidad de FDN disminuye conforme transcurre el proceso de ensilaje, antes aplicar la técnica de digestibilidad presento valores entre 61.47 – 68.94+0.52% durante todo el proceso, después de aplicar la técnica los valores fluctuaron entre 75 – 80%, por lo cual no hay digestibilidad de Fibra Detergente Neutro, lo que se traduce que el material no es aprovechado para la nutrición del rumiante.

Digestibilidad de Proteína cruda

En la digestibilidad de proteína cruda al inicio del proceso de ensilaje (**Fig. 16**) hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$), el tratamiento que fue adicionado con 50% de lactosuero posee la mayor digestibilidad de proteína cruda $57.09 \pm 2.89\%$.

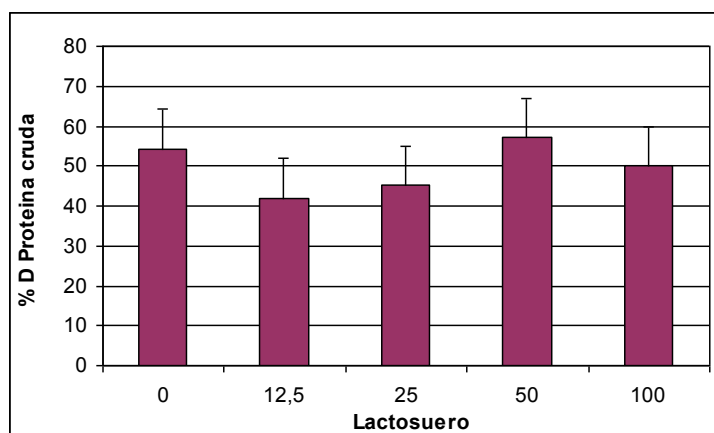


Figura 16. Digestibilidad de Proteína cruda al inicio del proceso de ensilaje.

El comportamiento de la digestibilidad de proteína cruda durante el proceso ensilaje (**Fig. 17**) presento diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos. De 0 a 45 días se presento una disminución en la digestibilidad de proteína, lo anterior es debido a que al inicio del proceso de ensilaje los elementos no han sufrido ningún efecto a causa del proceso de fermentación y el incremento de 45 a 90 días es debido a la producción de proteína microbiana.

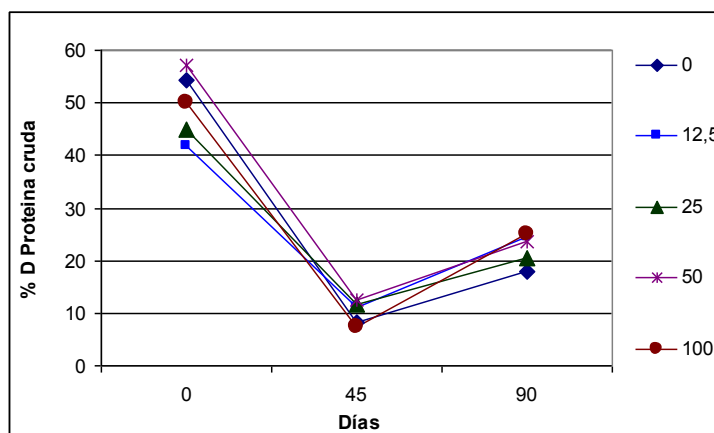


Figura 17. Digestibilidad de Proteína cruda durante el proceso de ensilaje.

Digestibilidad de Cenizas

La digestibilidad de cenizas al inicio del proceso de ensilaje mostró valores entre 53.15 – 59.29+1.13% con diferencias significativas ($P < 0.05$) (**Fig. 18**).

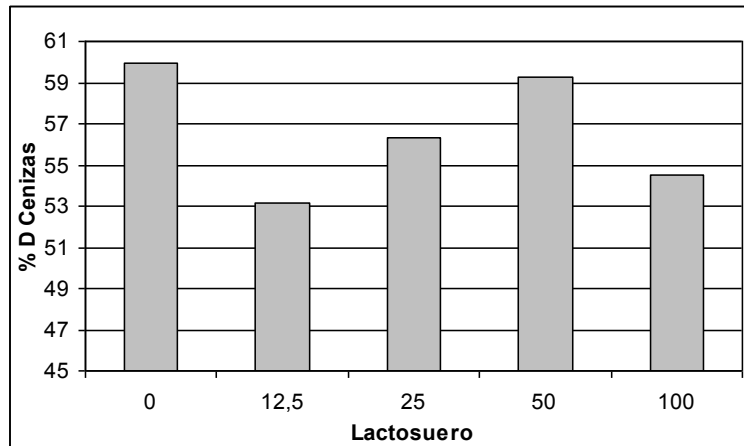


Figura 18. Digestibilidad de cenizas el inicio del proceso de ensilaje.

La digestibilidad de cenizas durante el proceso de ensilaje (**Fig. 19**) muestra un comportamiento creciente, con diferencias significativas ($P < 0.05$), mostrando valores entre 62.71 a 72.49+1.97% para los tratamientos con 100 y 25% de LA respectivamente a los 90 días. González, (2006), señala que durante la preservación de forraje mediante la técnica de ensilaje hay pérdida de componentes, consecuentemente el agua generada durante este proceso reduce el contenido de materia seca, mientras que la desaparición de carbohidratos solubles inducen a un pasivo incremento de otros componentes como minerales.

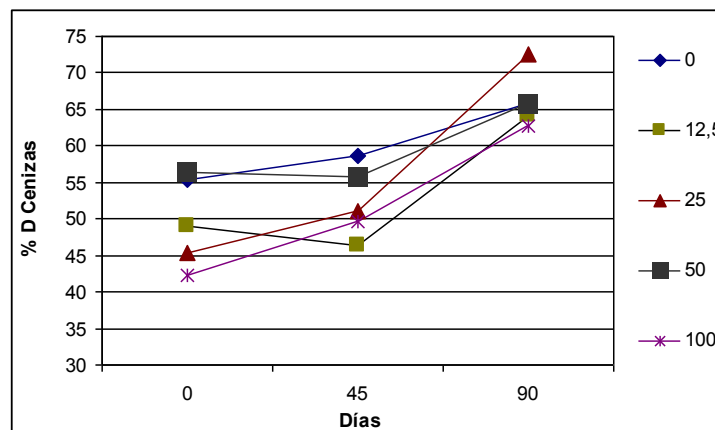


Figura 19. Digestibilidad de Cenizas durante el proceso de ensilaje

VII. CONCLUSIONES

El ensilajes de paja de trigo con micelio de *PO*, adicionado con diferentes concentraciones de Lactosuero ácido (0, 12.5, 25, 50 y 100), al cual se le tomaron muestras a los 0, 45 y 90 días, no reporto las condiciones idóneas en ninguna de las concentración de lactosuero para obtener un buen ensilaje, ya que el pH inicial fue incrementando de 6 a los 0 días a 8 a los 45 y 90 días.

- El contenido de materia seca presento variaciones que afectaron el proceso de ensilaje y por lo tanto presento digestibilidades menores que en ensilajes de buena calidad.
- El contenido de Fibra Detergente Neutro durante el proceso de ensilaje concuerda con el grado de madurez que presenta el material usado para ensilar. Pero no hay digestibilidad de Fibra Detergente Neutro.
- El contenido de proteína cruda se incremento conforme transcurre el proceso de ensilaje. La digestibilidad de proteína presenta sus valores más altos al inicio del proceso de ensilaje.
- El Extracto Libre de Nitrógeno presenta un comportamiento normal.
- El contenido de cenizas presenta un incremento durante el proceso de ensilaje y presenta una digestibilidad creciente de 0 a 90 días durante el proceso de ensilaje.
- El contenido de grasa que contiene el material usado es mínimo, por lo anterior es despreciable.

VIII. RECOMENDACIONES

- En el análisis material de ensilaje, que generalmente son forrajes, es importante considerar las condiciones de análisis, ya que representa un factor clave para lograr una objetividad en los resultados.
- Cuando se manejan microsilos es importante asegurar que hay ausencia de oxígeno, de lo contrario esto puede afectar al buen desarrollo del microsililo, es recomendable usar microsilos que no contengan ningún tipo de orificio.
- En el uso de bolsas de nylon es importante la revisión constante de su estructura, para detectar posibles agujeros que pudieran ocasionar fuga de material en estudio y así interferir en la obtención de resultados.
- En la elaboración de microsilos es importante tomar medidas de limpieza para evitar la contaminación del material a ensilar.
- En el caso de la aplicación de aditivos, es conveniente aplicar de manera equitativa y total, para lograr la homogeneidad de el material en estudio, para lo cual se recomienda el uso de atomizadores para lograr impregnar de forma total.

IX. REFERENCIAS

- Abu Asan, O., Islhida, M., Dunkri, J. Mohd. S., Tajuddin, Z. Ahmad. 1996. *Oil palm fronds as a roughage feed source for ruminants in malaysia*. Extension Bullerin 420. Food & fertilizer Technology center for aspac region, Taipei, Taiwan.
- Alderete V. G., 2005. Uso de lactosuero como aditivo en el ensilaje de paja de desecho de hongos comestibles. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Tesis de licenciatura en Ingeniería Agroindustrial.
- AOAC, 1975. 12th Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D. C.
- Ashbell, G., Weinberg, G., y Hen, Y. 1995. Studies of quality parameters of a variety of ensiled broiler litter. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 52: 271-278.
- Bath, L.D., Dickinson, F., Tucker, H. y Appleman R., 1982. Ganado lechero principios, practices y beneficios. Ed. Interamericana S.A. de C.V. Segunda edición, pp: 14.
- Bolsen, K. K., Ashbell, A., y Wilkinson, J. M. 1995. Silage additives., I : R.J. Wallace & A. Chenson (eds) *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*. Weinheim, germany: vch verlasgsgesellschaft. p. 33-54.
- Bolsen, K. K., Hidker, J. L. 1995. Silage additives USA. Canterbury, Uk: Chalcombe Publications. pág:5.
- Camacho, G. S., Macias, R. F., Ramos, S. P. Y Núñez, F. A. 2003. Selección de sustrato para producir hongos setas (*Pleurotus ostreatus*). Facultad de Ingeniería en Sistemas, UAM, México.
- Campos, R. G., Macias, R.F., Ramos, S.P., Nuñez, F.A., 2003. Selección de sustrato para producir Hongos setas (*pleurotus ostreatus*). Facultad de Ingenieria en sistemas. U.A.M. México.
- Canales, L. C., Gutiérrez, A.M. Rodríguez, A.H., Chavarria, N.H. 2002. Modelado de la cinética de producción de *Kluyveromyces marxianus* y *K. lactis* en lactosuero, usando redes neuronales. 3er. Simposio internacional sobre

ingeniería de Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos, México.

- Church, D. C. y Pond W. G., 1987. fundamentos de Nutrición y alimentación de Animales., Ed. LIMUSA, México, D. F., pp.: 83-86, 103-105.
- Church, D. C. y Pond W. G., 1998. Fundamentos de Nutrición de Animales., Ed. UTEHA, NORIEGA EDITORES, PP.: 320-321.
- Cobos, M. P. 1990. Tecnología de ensilados. Colegio de postgraduados. Centro de Ganadería. Memorias UACH. Pp. 101-127.
- Davriese, D. R., Merry, R. J., Williams, A. P., Bakewell, E. C., Leemans, D. K. y Tweed J. K. 1998. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar contenn. J. Dairy Sci. 81:444-453.
- Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H., Spoelstra, S. F. 1997. Inoculation of silage with a strain of lactobacillus buchneri inhibits yeast growth and improves aerobic stability. Abstract 3.18. in: Workshop Proc. Lactic 97. Caen, France, 10-12 September 1997.
- Driehuis, F., y Van Wiskelaar, P. G. 1996. Effects of addition of formic, acetic, o Propionic acid to maize silage and low dry matter grass silage on the microbial flora and aerobic stability in: Jones et al., 1996, q. v. p. 256-257.
- Evangelista L. y Ortega M., 2006. Mejora del proceso de ensilaje de maíz por adición de lactosuero ácido. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias.
- Falla-Cabrera, L.G. 1995. Salud y Contaminación, Manual para promotores Ambientales. Serie Nuestra Tierra. Consejo de concentración Ciudadana de Mejoramiento Ambiental para el Desarrollo Sostenible.
- Fagbenro, O. A. y Bello, O. O. A. 1997. Preparation, nutrient composition and digestibility of fermented shrimp head silage. Fd. Chem., 60:489-493.
- Fernández, F. M. 2001. El cultivo de setas. Asesoramiento técnico en hongos comestibles. UACH, México.
- Frevel, D. J., y Carroll, D. J. 1998. Ensiling SALT-preserved shrimp waste with grass straw and molasses. Anim. Feed. Sci. Technol., 61:241-249.

- Glewen, M. J. y Young, A. W. 1982. Effect of ammoniation on the re-fermentation of corn silage. *J. Anim. Sci.*, 54:713-718.
- González, J., J. Faría-Mármol, C.A. Rodríguez, A. Martínez, 2006. Effects of ensiling on ruminal degradability and intestinal digestibility of Italian rye-grass. *Animal Feed Science and Technology*, Madrid, España. 136:38–50
- Gosselink, J.M.T, Dulphy, J.P., Poncet, C., Taminga, S y Cone, J.W. 2004. Prediction of forage digestibility in ruminants using in situ and in vitro techniques, *Animal Feed Science and Technology*, *Saint-Genès Champanelle, France*, 115:227–246
- Hayashi, K. J. 1990. *Diary Sci.* 73: 579-583.
- Haresing, W. y Cole D. J. A. 1988. Avances en la nutrición de los rumiantes. Ed. ACRIBIA, S. A. pp.24
- Harmond B., Fontenot J. and Webb K. 1999. Ensiled broiler letter and corn forage. I. Fermentation Characteristic. *J. Animal Science* 40(1):144-155.
- Honig, H., y Woolford, M. K. 1980. Changes in silage on exposure to air. In: C. Thomas (ed) *Forage Conservation in the 80s*. BGS Occasional Symposium, No. 11 Huerley, UK: British Grassland Society. p. 76-81.
- Huantaned P., Nousiainen J. J. Khalili M., Jaakkola S. y Heikila T. 2002. Relationships between silage fermentation characteristics and milk production parameters. Analyses of literature data. *Livestock Production Science* 81:57-73.
- Jean, J.A. 1991. *Ciencia y Tecnología de la leche*, Ed. ACRIBIA, Zaragoza España., pp.: 10.
- Jelen, P. 1979. *Industrial Whey Processing Technology: An Overview*. *J. Agric. Food Chem.* 27(4):658-661.
- Jonsson, A., Linberg, H., Sundas, S., Lingvall, P., y Lindgren, S. 1990. Effect of additives on quality of big-bale silage. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 31:139-155.
- Kung, L., Jr. 1996. Use of additives in silage fermentation. In: *Direct-fed Microbial Enzyme and Forage Additive Compendium*. Minnetonka, MN: Miller Publishing. P. 37-42.
- Lattemae, P., y Lingvall, P. 1996. Effect of hexamine and sodium nitrite in combination with sodium benzoate and sodium propionate on fermentation and

storage stability of wilted and long cut grass silage. Swed. J. Agr. Res. 26:135-146.

- Madigan, M., Martinko J. y Parker, J., 2004. Brock Biología de los Microorganismos. 10^a edición, Ed PEARSON Prentice Hall. España, pp.: 100.
- Maynar, L. A., Lossli, J. K., Hintz, H. F. y Warner, R. G. 1987. Nutrición Animal. Ed. McGraw Hill.
- McDonald, P., Henderson, A. R., y Heron, S. J. E. 1991. The Biochemistry of Silage. 2nd Ed. Marlow, UK: Chalcombe Publications.
- Merry, R. J., Lowes, K. F. & Winter, A. 1997. Current and future approaches to biocontrol in silage. pp.: 17-27.
- Miller, W. J. 1989. Nutrición y alimentación del ganado vacuno lechero. Ed ACRIBIA, S. A. pp.:55.
- Moon, N. J. 1983. Inhibition of the growth of acid-tolerant yeast by acetate, lactate and propionate and synergetic mixtures. J. Appl. Bacteriol., 55:454-460.
- Montes R., 2002. Efecto de bacterias ácido lácticas y enzimas a diferentes concentraciones sobre las características físico-químicas del ensilado de maíz. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial.
- Moran, J. P., Pullar, D., y Owen, T. R. 1993. The development of a novel bacterial inoculant to reduce mould spoilage and improve the silage fermentation in big bale silage. In: P. O'Kiely, M. O'Connell & J. Murphy (eds) Silage Research 1993, Proc. 10th Int. Conf. Silage Res. Dublin City University, Dublin, 6-8 September 1993. pp. 85-86.
- Muller, A., Daufin, G., Chaufer, B. 1999. Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey. Journal of Membrane Science, 153:9-21.
- Mustafa, A.F., 2004. In situ forestomach and intestinal nutrient digestibilities of sweet corn residues, Animal Feed Science and Technology, Lennoxville, Que., Canada., 114:287-293

- Nour, A. A., Nour, A. M., El-Shazely, K.A., Abaza, M., Borhami, B. E., y Naga, M. A. 1981. Evaluation of some agro-industrial by products for sheep and lacting cows. *Alex. J. Agric. Res.*, 29:125-1142.
- Orskov, E.R., 1978. Importancia relativa de la digestión ruminal y postruminal respecto al la nutrición protéica y energética en rumiantes. *Prod. Anim. Trop.* 3 : 93.
- Oude Elferink, S. H., Driehus, F., Krooneman, J., Gottschal, J. C., y Spoelstra, S. F. 1999. *Lactobacillus buchneri* can improve the aerobic stability of silage via a novel fermentation pathway, the anaerobic degradation of lactic acid to acetic and 1,2-propanediol. p. 266-267, in: Pauly, 1999.
- Pahlow, G., y Honing, H. 1996. Wirkungsweise und Einsatzgrenzen von Silage-Impfkulture aus Michsaurebakterien. 1. Mitteilung. *Das wirtschaftseigene Futter*, 32:20-35.
- Piltz, J. W., Kaiser, A. G. y Hamilton, J. F. 1999. The use of molasses to improve the fermentation of low-dry-matter Kikuyu Grass silages. In: Mennetje L. Editor, *Silage marking in the tropics, With Particular emphasis on smallklers. Proceedings of the FAO electronic Conference on tropical silage.* Pp.: 165-166.
- Rider, S. 1997. Forage additives. *Farmers Weely*, 21 November 1997 (Suppl.): S1-S16.
- Romero, J. G., Chavarría, N. H., Rodríguez, A. H. 2002. Producción de goma Xantana en cultivo sumergido usando lactosuero. Modelado con redes neuronales. 3er. Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos, México.
- Shimada, A. M., 2005, *Nutrición Animal*, ed. TRILLAS, España, pp.: 101-105.
- Sibanda, S., Jingura, R. M. y Topos, J. H. 1997. The effect of level of inclusion of the legume *Desmodium uncinatum* and the use of molasses o ground maize as additives on the chemical composition of grass and maize legume silages, *Anim. Feed Sci. Technol.* 68:295-305.
- Sinclair, L. A., Jackson, Ma., Huntington,R. L. y Reandom, R. J. 2004. The effects of processed, urea- treated whole-crop wheat or maize silage and

supplementation of whole-crop wheat on the performance of dairy cows. *Livestock Production Science* p. 1.

- Soto, S. S., 1995. Cinética de la digestión ruminal y composición química de especies forrajeras en un matorral arbocrasicaulescente Bajo Condiciones Desérticas I. Invierno., Tesis para obtener el título de Ing. Zootecnista, La Paz Baja California Sur, pp.: 9-10.
- Spreer, E. 1991. El lactosuero y su aprovechamiento en lactología Industrial. Ed. Acribia. p. 527-529.
- Staudacher W., Pahlow G. y Hiong H. 1999. Certification of silage additives in Germany by DLG. In: Pauly, 1999, q. v. p. 239-240.
- Susane, S.N. 2003. Food Analysis. Third Edition, Klumer ACADEMIC / PLENUM PUBLISHERS, New York. Pp.: 50.
- Van Soest, P.J., 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant, Second Ed. Cornell University Press, Ithaca, USA.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Vérité, R., Michalet-Doreau, B., Chapoutot, P., Peyraud, J.-L., Poncet, C., 1987. Révision du système des protéines digestibles dans l'intestin (PDI). *Bull. Technol. CRZV Theix INRA* 70, 19–34.

- Wangness P. J., Mueller L. 1991. Maximum forage for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 65:1.
- Weinberg, Z. G. y Muck, R. E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.*, 19:53-68.
- Windsor M. y Barlow S. 1982. Introduction of fisher by products. Fishing News Book Ltda. p. 84-100.
- Wilkinson, R. j., 1996. The nutritive value of silage. In. Haresigh, W. y D. J. A. Cole. Recent developments in ruminal nutrition. Better worths, London.
- Woolford, M. K. 1975a. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1-C12) as potential silage additives. *J. Sci. Food Agr.* 26:219-228.

- Woolford, M. K. 1975b. *Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives*. J. Sci. Food Agr. 26:229-237.
- Woolford, M. K. 1984. *The silage fermentation*. Marcel-Dekker. Inc. New York, U.S.A.
- Woolford, M. K. 1990. *The detrimental effect of air on silage*. J. Appl. Bact. 68:1.