

EVALUACION DE ADITIVOS PARA EL CONTROL DE HONGOS EN MICROENSILADOS DE ZACATE RYE GRASS (*Lolium multiflorum* LAM.) Y SU IMPACTO SOBRE EL CONTENIDO NUTRITIVO

MARIA DEL ROCIO PARADA HERNANDEZ



BIBLIOTECA
EGIDIO G. REBONATO
BANCO DE TESIS
U.A.A.A.N.

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN NUTRICION ANIMAL



Universidad Autónoma Agraria
"Antonio Narro"

PROGRAMA DE GRADUADOS
Buenavista, Saltillo, Coah.

DICIEMBRE DE 1999

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

PROGRAMA DE GRADUADOS

EVALUACION DE ADITIVOS PARA EL CONTROL DE HONGOS
EN MICROENSILADOS DE ZACATE RYE GRASS
(*Lolium multiflorum* Lam) Y SU IMPACTO SOBRE
EL CONTENIDO NUTRITIVO

TESIS

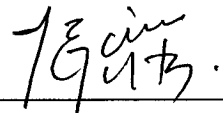
POR

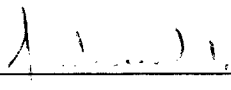
MARIA DEL ROCIO PARADA HERNANDEZ

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada
como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN NUTRICION ANIMAL

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal: 
M.C. José Eduardo García Martínez

Asesor: 
Dr. Heriberto Díaz Solís

Asesor: 
M.C. Regino Morones Reza

Asesor Externo: 
M.C. Raúl Hernández Ramírez


Dr. Ramiro López Trujillo
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Diciembre de 1999.

1202

AGRADECIMIENTOS

La Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro a través del Departamento de Nutrición Animal y de una servidora agradecen muy especialmente a la Empresa **AGROMOD S.A. de C.V.** por el financiamiento de la presente investigación, en especial a los **Ingenieros Juan Carlos De la Garza, Felipe Sánchez y Cristóbal Téllez** y en particular al **M.C. Raúl Hernández** por todo el apoyo, tiempo invertido e interés en el presente trabajo.

Un sincero agradecimiento a la Empresa **ALLTECH** por la donación de los productos utilizados, especialmente a la **Dra. Gladys de Hoyos, M.C. Ramón Valenzuela y MVZ. Francisco Papadakis.**

Al **Ing. Químico J. Antonio Villarreal** de la Fac. de Ciencias Químicas por su valiosa ayuda en el cultivo del hongo, por el tiempo invertido, desinteresada participación y gran aporte de sus conocimientos de Microbiología.

Al **M.C. Eduardo García** por su apoyo en la investigación y asesoramiento durante mis estudios de postgrado.

Al **Ph.d Heriberto Díaz** por su amistad y tiempo invertido en el análisis de la información, compartiendo sin egoísmo sus conocimientos.

Al **M.C. Regino Morones** por su participación en la presente investigación.

Al **M.C. Ramón García C.** por su amistad y gran apoyo durante mis estudios de postgrado.

Al **MVZ. Luis A. Clemente B.** por su amistad, apoyo y por compartirme su tiempo y conocimientos.

A **Silvia González y Marianela Kauffman** por compartir los buenos y malos momentos durante nuestra maestría.

A la **Fam. González Aldaco** por recibirme en su hogar como una hija mas.

A las personas que desinteresadamente y mostrando gran profesionalismo apoyaron en el gran trabajo de Laboratorio: **Luis Clemente, Sra. Laura Fuentes, Sra María de Jesús Sánchez, Vicente Jiménez, Mario García, Alejandro Arteaga, J. Antonio Villatoro, Gonzalo Saenz, Víctor Ibarra y Aracely Pérez.**

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Catalina Hernández Moreno y Heladio Parada García

Ejemplo de constante superación

A MIS HERMANOS

Lucy, Tommy, Manuel y Katy

Por su apoyo en mi constante superación

A MIS SOBRINOS

Héctor, Alberto, Mayra, Carolina y Erick

Motivo de constante superación.

COMPENDIO

**Evaluación de Aditivos para el Control de Hongos en Microensilados de
Zacate Rye grass (*Lolium multiflorum* Lam) y su Impacto Sobre
el Contenido Nutritivo**

POR

MARÍA DEL ROCIO PARADA HERNÁNDEZ

MAESTRÍA

NUTRICIÓN ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, DICIEMBRE 1999

Ing. M.C. J. Eduardo García Martínez -Asesor-

**Palabras Claves: Ensilados, Fermentación, Aditivos, Hongos, Inhibidor
Inoculante, Contenido Nutritivo**

En el presente estudio sesenta y cuatro bolsas de microensilados de zacate rye grass de 23 kg de peso se asignaron aleatoriamente a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2X2X4 con cuatro repeticiones. (El primer factor corresponde a aplicación de azufre, el segundo a inoculación de hongo *Aspergillus* y el tercero a los distintos aditivos: sin aditivo, inhibidor (IAP), inoculante (IAB) y combinación

inhibidor-inoculante), con la finalidad de controlar la incidencia de hongos y conocer el impacto del aditivo sobre el contenido nutritivo al día 45 de iniciado el proceso de fermentación; las variables analizadas fueron: presencia de hongo, T dentro de la bolsa, pH, materia seca (MS), cenizas (C), extracto etéreo (EE), fibra cruda (FC), proteína cruda (PC), extracto libre de nitrógeno (ELN) y total de nutrientes digestibles (TND), se reportaron las variables que mostraron los mayores coeficientes de correlación durante los eventos de muestreo y se analizó la relación entre variables por medio de componentes principales. El análisis de las variables al día 45 muestra diferencia altamente significativa ($P < .01$) en la respuesta de las variables persistencia y C al aditivo, los valores más altos en el porcentaje de ausencia de hongo lo reportan los tratamientos donde se utilizó IAP y la combinación; el contenido más alto de C lo reportan los tratamientos donde se utilizó el IAP. Se observó respuesta significativa ($P < .05$) en persistencia a la interacción inóculo-azufre, en C fue al inóculo, el ELN para los factores azufre y aditivo y en PC al azufre. El resto de las variables no muestran diferencia significativa ($P > .05$) a los factores ni a las interacciones. Se observó relación positiva en las variables persistencia-aditivo, T-MS, MS-C, C-aditivo, C-PC, EE-PC ; y relaciones negativas entre las variables: MS-FC, C-ELN y EE-ELN. El método por componentes principales relacionó las variables C, PC y EE negativamente con ELN, a MS con T y la persistencia de hongo con el aditivo.

ABSTRACT

Additives Assessment for Fungus Control in Rye grass (*Lolium multiflorum* Lam) Microsilages and its Impact About Nutritive Content

BY

MARÍA DEL ROCIO PARADA HERNÁNDEZ

MASTER OF SCIENCE

ANIMAL NUTRITION

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, DECEMBER 1999

Ing. M.C. J. Eduardo García Martínez -Adviser-

7 words: Ensilage, Fermentation, Additives, Inhibit, Inoculater, Fungus, Nutritive Content.

In the present study sixty four bags of rye grass microsilage weighting kg at complete randomly factorial 2X2X4 design with four repetition (the t factor correspond to sulfur application, second to *Aspergillus* fungus culation and third to various additives: without additive, inhibit, culaterr and combination inhibit-inoculater), with aim to control fungus ct and to know the impact of additive about nutritive content in day 45 r starting the fermentation process; the

analyzed variables were: fungus presence, inside temperature of bags, pH, dry matter, ash, ether extract, crude fiber, crude protein, nitrogen free extract and nutrients digestibles total, the only reported variables were the ones showed bigger correlation coefficient during sampling and analyzed relation between variables by means principals components. The analysis of variables at day 45 showed high significance ($P < .01$) in response of variables persistence and ash to additive, the highest values in percent of fungus presence were reported by the treatments where utilized inhibit and combination; the highest content of ash were reported by the treatments in which inoculater were utilized. No differences ($P > .05$) were found in persistence to the interaction inoculater-sulfur, in ash was to the inoculater, nitrogen free extract for factors sulfur and additive and in crude protein was to the sulfur. The remainder variables didn't show significance difference to factors neither its interactions. positive relation were found in variables persistence-additive, temperature-dry matter, dry matter-ash, ash-additive, ash-crude protein, ether extract crude protein; and negative relations between variables: dry matter-crude fiber, ash-nitrogen free extract and ether extract-nitrogen free extract. The method of principals components related negatively the variables ash, crude protein and ether extract with nitrogen free extract, dry matter with temperature and the persistence of fungus with additive.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág
INDICE DE CUADROS	xi
INDICE DE FIGURAS	xii
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	4
Ensilajes	4
El Proceso de Fermentación Durante el Ensilaje.....	4
Etapas del Ensilaje	5
Fase Aeróbica	6
Fase Anaerobica	6
Fase Estable	7
Silos plásticos	8
Contenido Nutritivo del Ensilaje	8
Factores que influyen para una adecuada fermentación	9
Contaminación Microbiana de los Ensilajes	10
Características de los Hongos	11
Hongos de Almacenamiento en los Ensilajes	12
Hongos Productores de Aflatoxinas	13
Control de Crecimiento de los Hongos	15
Aditivos para Ensilajes	17
MATERIALES Y METODOS	26
Descripción del Area de Estudio	26
Cultivo del Hongo	26
Materiales Utilizados	27
Descripción de los Tratamientos	28
Diseño de los Tratamientos	29
Análisis de Laboratorio y Variables Evaluadas	31
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	32
RESULTADOS	33
Análisis de las Variables al día 45	33
Persistencia del hongo	33
Potencial Hidrogeno	35
Temperatura y Materia Seca.....	35
Cenizas	36
Extracto Etéreo	37
Proteína Cruda	38
Fibra Cruda	38
Extracto Libre de Nitrógeno	38

Total de Nutrientes Digestibles	39
Análisis de las Variables Durante los Eventos de Muestreo.....	39
Persistencia	39
Potencial Hidrogeno	40
Temperatura y Materia Seca	41
Cenizas	42
Extracto Etéreo	44
Extracto Libre de Nitrógeno	44
Análisis Multivariado	46
CONCLUSIONES	49
Análisis de las Variables al día 45 y Durante los Eventos de	
Muestreo	49
Persistencia del Hongo	49
Potencial Hidrogeno	50
Temperatura	51
Materia Seca	51
Cenizas	52
Extracto Etéreo y Proteína Cruda	53
Fibra Cruda	54
Extracto Libre de Nitrógeno	54
Análisis Multivariado	55
CONCLUSIONES	57
RESUMEN	58
ABSTRACTO CITADA	61
INDICE	65

INDICE DE CUADROS

Cuadro Número	Página
2.1	Mínima cantidad de agua requerida para el crecimiento de hongos de almacén.....10
2.2	Hongos que producen Aflatoxinas <i>in vitro</i>14
2.3	Clasificación de los aditivos comúnmente empleados en los ensilajes.....18
2.4	Efecto de la adición de varios niveles de melaza y urea a ensilajes de sorgo forrajero(base seca)21
3.1	Diseño de los tratamientos que corresponden a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 X 2 X 430
4.1	Probabilidad de respuesta (presencia o ausencia) de acuerdo al aditivo que contiene el tratamiento.....34
4.2	Promedio de pH de los tratamientos observados al día 45 de iniciado el proceso de fermentación.....35
4.3	Cuadro de comparación de medias para la variable cenizas.....36
4.4	Valores promedio de pH en los diferentes tratamientos conforme avanza el periodo de fermentación.....41
4.5	Eigenvalores y porcentaje de la varianza explicada.....47
4.6	Factores de carga que muestran la relación de las variables dentro de cada componente.....47

INDICE DE FIGURAS

Figura Número	Página
1	Probabilidad de respuesta (presencia o ausencia) de acuerdo al aditivo que contiene el tratamiento.....34
2	Contenido de cenizas promedio de acuerdo al aditivo aplicado al día 45 de iniciado el proceso de fermentación.....37
3	Persistencia de aparición de hongos filamentosos de acuerdo al aditivo aplicado y al valor de pH prevaleciente, (1 sin aditivo; 2 inhibidor a base de ácido propiónico; 3 inoculante a base de bacterias; 4 combinación).....40
4	Relación del contenido de cenizas de acuerdo al aditivo aplicado (1 sin aditivo; 2 inhibidor a base de ácido propiónico; 3 inoculante a base de bacterias; 4 combinación).....42
5	Distribución de las observaciones del contenido de proteína cruda del zacate rye grass durante los eventos de muestreo en relación al contenido de cenizas.....43
5	Distribución de las observaciones del contenido de extracto libre de nitrógeno durante los eventos de muestreo en relación al contenido de cenizas.....43
7	Distribución de las observaciones del contenido de proteína cruda del zacate rye grass durante los eventos de muestreo en relación al contenido de extracto etéreo.....45
3	Distribución de las observaciones del contenido de extracto libre de nitrógeno del zacate rye grass durante los eventos de muestreo en relación al contenido de extracto etéreo.....45

.9	Relación entre el contenido de extracto libre de nitrógeno y los aditivos aplicados (sin aditivo inhibidor a base de ácido propiónico; inoculante a base de bacterias; combinación).....	46
.10	Relación entre los componentes principales 1 y 2.....	48
.11	Relación entre los componentes principales 1 y 3.....	48

INTRODUCCION

La producción de forraje no es constante durante todo el año debido a factores, sobre todo climáticos, que afectan la cantidad y calidad nutritiva del forraje producido. Por esta razón se buscan alternativas para conservar este forraje producido en épocas de abundancias para su posterior utilización; una de las alternativas para reservar el forraje es el ensilarlo en microsilos.

El microsilo presenta las ventajas de conservar el material para períodos en que no se disponga de material forrajero, así como ser una forma en la que el forraje puede ser presentado al mercado.

El material ensilado tiende a presentar problemas de macenamiento (debido al contenido de humedad y pH al momento de sellada la bolsa) como lo es el ataque del hongo *Aspergillus* spp., que crea una capa blanca sobre el material, lo que ocasiona baja aceptación por parte de los compradores y constituye un factor de riesgo para el animal.

Dos factores determinan la calidad del ensilado: los biológicos y tecnológicos. Los factores biológicos pueden manipularse limitadamente, tanto los factores tecnológicos pueden manipularse para lograr una nofermentación láctica en el proceso de ensilaje (Diego, 1998).

Una alternativa de solución la representa el uso de aditivos que pueden agregarse al momento de ensilar, con lo que se busca lograr un silado de alta calidad (Seglar, 1997 <http://www.pioneer.com/xweb/usast/restech/nutrition/dpm/htm.fer>). Los aditivos modifican el pH y de esta manera se disminuye la incidencia de microorganismos.

Por lo anterior los objetivos del presente trabajo son: determinar el tipo que evite la proliferación de hongos en microensilados de zacate rye grass y evaluar el impacto del aditivo sobre el contenido nutritivo del zacate rye grass sometido a un proceso de ensilaje.

Resumen

Los aditivos ácidos y las bacterias acidolácticas mantendrán las condiciones ácidas del ensilado disminuyendo o evitando la proliferación de microorganismos indeseables.

Los aditivos ácidos y las bacterias acidolácticas modifican el contenido nutritivo del material ensilado al actuar sobre las fracciones nutritivas.

REVISION DE LITERATURA

Ensilajes

El ensilado constituye el método de conservación de forrajes más utilizado en el mundo, debido a su independencia de las condiciones climáticas en comparación a la henoificación (Wernli y Ojeda, 1990), se ha usado desde tiempos muy remotos; el forraje preservado durante periodos de escasez es usado principalmente en la alimentación de ganado de leche y de carne, también en borregos y muy poco en caballos (Ensminger *et al.*, 1990). Si se cosecha la planta en su máxima calidad nutritiva el ensilado conserva los principios nutritivos por un mayor periodo de tiempo, con menor pérdida de nutrientes y con mayor calidad, por lo que se evita el tener que suplementar (Cabanillas y Peñuñuri, 1984 <http://www.uach.cl>).

El Proceso de Fermentación Durante el Ensilaje

El proceso de ensilaje se refiere a los cambios que tienen lugar en los forrajes que son almacenados con un suficiente contenido de

humedad para una adecuada fermentación en ausencia de aire, proceso de ensilaje es gobernado por la interacción de tres factores: composición química de la planta, la cantidad de aire que entra y actividad de la población microbial (Ensminger *et al.*, 1990). Consiste los productos de la fermentación derivados de los carbohidratos estructurales y proteínas del forraje, lo que le da características nutricionales distintas, el valor nutricional del ensilaje es inferior al forraje en verde y se registran algunas pérdidas de materia seca (Wer y Ojeda, 1990), se ha observado que en ensilados con un contenido humedad mayor de 65 por ciento hay filtrado y pérdida de nutrientes se fomenta el desarrollo de clostridrios, a niveles menores de 60 por ciento el calor excesivo limita el uso de oxígeno (Bjorge, 1996 <http://itsds-3.agric.gor.ab.ca/crops/forage/silage/silag2.html>), forrajes con alto contenido de agua son difíciles de ensilar ya que el agua diluye los carbohidratos, por otra parte el forraje con alto contenido de materia seca es difícil de compactar y si queda aire puede haber quemaduras y formación de hongos (Cabañillas y Peñuñuri, 1984).

Etapas del Ensilaje

El proceso de ensilaje requiere de dos a tres semanas, tiempo en el que ocurren tres fases muy características (Ensminger *et al.*, 1990) aunque hay quien considera seis (Bjorge, 1996).

Fase Aeróbica

Es la fase de respiración, las células del forraje que aun están vivas, toman oxígeno, las enzimas de las plantas y las bacterias aeróbicas usan los carbohidratos fácilmente fermentables produciendo calor, agua y bióxido de carbono (CO₂), el oxígeno se agota en cuatro a cinco horas, pero el CO₂ aun se acumula por 48 horas; la temperatura se incrementa sobre un periodo de 15 días, algunas veces excede 30 a 32°C, posteriormente disminuye gradualmente y a partir de este punto prevalecen las condiciones anaeróbicas (Ensminger *et al.*, 1990), durante este proceso se ven afectadas proteínas y grasas, el incremento de temperatura depende de la cantidad de oxígeno disponible (Watson y Smith, 1984), si la temperatura generada en condiciones aeróbicas es muy alta produce daños en el material ensilado (Bjorge, 1996).

Fase Anaeróbica

Cuando el oxígeno que había quedado atrapado se ha agotado, las bacterias anaeróbicas (principalmente formadoras de ácido y proteolíticas) se multiplican vertiginosamente, los hongos y levaduras desaparecen, pero continua un sistema enzimático que produce alcohol y otros productos finales; la actividad anaeróbica combinada produce los siguientes cambios: los carbohidratos complejos y los azúcares se

fermenten a ácido láctico, algo de acético y una pequeña cantidad de otros ácidos y alcoholes; las proteínas se fragmentan en amoníaco, aminoácidos, aminas y amidas; la acidez finalmente alcanza un punto en que las mismas bacterias son eliminadas, y el proceso fermentativo se completa. Si el proceso se llevó a cabo eficientemente la concentración de ácido láctico debe ser de cuatro a diez por ciento de la materia seca (Ensminger *et al.*, 1990), el ácido láctico es no volátil, el butírico es el responsable del olor desagradable de los silos mal preservados, al realizar el ensilaje se desea que predomine el ácido láctico o cuando menos que el butírico esté ausente (Watson y Smith, 1984).

Fase Estable

Cuando se alcanza un pH de 4.2 o menor, el ensilaje se estabiliza y puede durar años siempre y cuando el aire no penetre (Ensminger *et al.*, 1990), la fermentación cesa después de tres a cuatro semanas cuando el pH es tan bajo que todo el crecimiento microbial se inhibe (Bjorge, 1996).

Silos Plásticos

El plástico (polietileno) es una alternativa para el uso de silos temporales, el forraje es comprimido por medio de una maquina especial, el forraje se preserva excelentemente mientras esta sellado y no es dañado por roedores, en el momento en que se requiera la bolsa se abre y se tiene el forraje disponible, las bolsas individuales son de varios tamaños (Ensminger *et al.*, 1990); si bien el método es muy efectivo, sellar las bolsas es una operación tediosa y si el forraje no tiene un adecuado contenido de humedad la fermentación puede ser muy pobre, por lo tanto la aplicación de aditivos no es uniforme, para las personas que no cuentan con el equipo de almacenamiento a gran escala o no quieren conservar una cantidad de forraje muy grande este tipo de silos resulta muy ventajoso (Raymond *et al.*, 1986).

Contenido Nutritivo del Ensilaje

El valor nutritivo depende de los cambios provocados por la actividad de las enzimas vegetales y microbianas durante el proceso de fermentación; si las condiciones no son las adecuadas para el proceso de fermentación se corre el riesgo que el material ensilado pierda su calidad nutritiva (Ensminger *et al.*, 1990; Roberts, 1995), la respiración celular del material ensilado tiene efecto sobre la temperatura

aumentándola lo que trae consigo reacciones indeseables entre proteínas y carbohidratos (Nuñez y Contreras, 1999).

Factores que Influyen para una Adecuada Fermentación

Para asegurar una adecuada fermentación es importante excluir totalmente el oxígeno; las bacterias anaeróbicas productoras de ácido láctico pueden utilizar los nutrientes que se pierden durante la respiración de la planta, el aire en el silo retrasa el rompimiento de las paredes celulares de la planta, lo que retrasa la fermentación y predispone al ataque de hongos (Bjorge, 1996).

La temperatura del ensilaje se incrementa cuando hay oxígeno presente y se activa la respiración celular, el mayor crecimiento de hongos ocurre a temperaturas altas.

El pH del ensilado detiene la fermentación, por lo que es importante lograr una rápida acidificación para reducir el crecimiento de microorganismos indeseables (Bjorge, 1996).

Contaminación Microbiana de los Ensilajes

Las células del material ensilado mueren y su contenido de carbohidratos, grasas y proteínas puede difundirse fuera de la masa y convertirse en alimento para los microorganismos, las condiciones para el crecimiento de estos microorganismos varía ampliamente, algunos requieren oxígeno. La presencia de microorganismos específicos depende de la forma en que el material sea ensilado. Entre los microorganismos que requieren oxígeno se encuentran las levaduras y mohos que tienen relevancia cuando en el material ensilado penetra aire, los mohos descomponen el producto (Hiriarth, 1998).

La planta forrajera es inoculada con una amplia cantidad de hongos y bacteria en campo, los hongos se desarrollan preferentemente en suelos ácidos, encontrándose en todos los horizontes del perfil del suelo, predominando en las zonas superficiales donde abunda la materia seca orgánica y hay una adecuada aireación, los géneros más comunes son: *Penicillium*, *Mucor*, *Trochoderma*, *Aspergillus* (Buckman y Brady, 1970), *Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium* que requieren altos porcentajes de agua, al contrario de los hongos de almacén como *Aspergillus* y *Penicillium* (Roberts, 1995).

Características de los Hongos

Los hongos son organismos heterótrofos que se reproducen medio de esporas, son multicelulares, filamentosos (Deacon, 1988) filamentos o hifas constituyen su cuerpo, muchas partes del hongo potencialmente capaces de crecer, utilizan casi todas las fuente carbono, la temperatura optima para muchas especies es de entre 30°C, el pH para el crecimiento de los hongos varia ampliamente algunos crecen bien a niveles de 4 a 7, la mayoría de los hongos aeróbicos, ciertas levaduras presentan capacidad facultativa (Alexopoulos *et al.*, 1996), además de la fuente de alimento, otros factores que influyen sobre el crecimiento de los hongos son la humedad (Cuadro 2.1) y a pesar de la creencia popular, los hongos no requieren oscuridad.

Cuadro 2.1 Mínima cantidad de agua requerida para el crecimiento de hongos de almacén

Especie	Mínima actividad de agua requerida
<i>Aspergillus halophilicus</i>	0.65-0.70
<i>Aspergillus restrictus</i>	0.70-0.75
<i>Aspergillus glaucus</i>	0.70-0.75
<i>Aspergillus candidus</i>	0.75-0.80
<i>Aspergillus versicolor</i>	0.80-0.85
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.80-0.85
<i>Aspergillus flavus</i>	0.80-0.85
<i>Penicillium spp</i>	0.85-0.90

Moreno (1988).

Hongos de Almacenamiento en los Ensilajes

La literatura reporta un amplio número de artículos sobre las aflatoxinas, por su poder carcinógeno, las cuales son producidas por hongos que crecen en productos almacenados que presentan susceptibilidad a la contaminación (Deacon, 1988).

La presencia de aflatoxinas en productos agrícolas depende de factores como la región donde se producen, estación del año, condiciones de crecimiento del cultivo, cosecha y almacenamiento; el impacto económico resultante de la contaminación por aflatoxinas durante la producción, comercialización y utilización de los productos alimenticios es muy alto (Cuca *et al.*, 1996).

En condiciones de almacenamiento no ideales dominan hongos *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. que ocasionan grandes pérdidas económicas y producen toxinas, existe registro de enfermedades y muertes de animales domésticos y del hombre ocasionadas por consumir alimento infectado con micotoxinas durante el almacenamiento (Campbell, 1985; Alexopoulos *et al.*, 1996). *Aspergillus* spp. no solo contamina durante el almacenamiento, ya que desde campo puede establecerse en el cultivo (Márquez y Tejada, 1992) de ahí la importancia de evitar altos contenidos de humedad.

Hongos Productores de Aflatoxinas

Si bien, de los hongos se obtienen muchos beneficios, algunas especies producen sustancias muy tóxicas como son las micotoxinas, por ejemplo *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* producen aflatoxinas que ocasionan cáncer en el hígado humano (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Los metabolitos secundarios de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* son llamadas aflatoxinas, se identificaron por primera vez en 1963, los niveles en el alimento son de 20 a 100 ppb pero varía de acuerdo a la localidad. Otras micotoxinas también producidas por especies de *Aspergillus* y *Penicillium* en los granos de cereales, soya y cacahuate son las ocratoxinas o nefrotoxinas que causan daño en hígado y riñón. La aspergillosis en humanos es ocasionada por la inhalación de la conidia que invade los espacios aireados del cuerpo, al ingerir las micotoxinas o cuando estas están en contacto con la piel si no ocasionan una enfermedad declarada, retardan el crecimiento, el vigor, la conversión de alimento y en general hay una reducción en la producción animal (Deacon, 1988) que va desde una mala absorción de nutrientes hasta la muerte del animal (Márquez y Tejada, 1988). *Aspergillus* es un género con cerca de 100 especies, para su crecimiento requiere de una humedad relativa de 65 a 90 por ciento (Cuadro 2.1).

Las aflatoxinas responsables de los trastornos biológicos en animales que las consumen, producidas por hongos del género *Aspergillus*, constituyen una familia de 14 toxinas que ocurren en la naturaleza, la B1 es la más importante de acuerdo a su toxicidad que se presenta con mayor frecuencia como se puede observar en el Cuadro 2.2 (Cuca *et al.*, 1996).

Cuadro 2.2 Hongos que producen Aflatoxinas *in vitro*

HONGO	AFLATOXINA			
	B1	B2	B3	B4
Grupo <i>Aspergillus</i>				
<i>A. flavus</i>	X	X	X	X
<i>A. parasiticus</i>	X	X	X	X
<i>A. niger</i>	X			
<i>A. ochraceus</i>	X			
Grupo <i>Penicillium</i>				
<i>P. puberulum</i>	X	X	X	X

Cuca *et al.* (1996)

Los animales muestran diferente grado de resistencia; los caballos y los herbívoros que tienen estómago simple y el intestino delgado e mayor sitio de absorción son más susceptibles a las micotoxinas que los rumiantes. En bovinos productores de leche la aflatoxina no solamente reduce la producción por parte del animal, sino que se corre el riesgo de que la aflatoxina sea secretada en la leche. En bovinos productores de carne se reduce la tasa de crecimiento y se incrementa la cantidad de alimento requerido por kilogramo de ganancia de peso (conversión alimenticia). Además de causar daños al hígado, un paso obligado en

cción carcinogénica de la aflatoxina es la conversión a una variedad de metabolitos mediados por los microsomas hepáticos y extrahepáticos (Sheperd *et al.*, 1995; Coulombe, 1993).

La aflatoxina B1 producida por *A. flavus* y *A. parasiticus*, es extremadamente tóxica y contamina material alimenticio muy ampliamente, por lo que el nivel de esta micotoxina es regulada por la Food and Drough Administration ya que no debe exceder 20 ppb en maíz destinado a bovino lechero (se reduce la motilidad del rumen, la digestión de la celulosa y la producción de ácidos grasos volátiles), 300 ppb para bovinos en engorda y cerdos, 300 ppb en la harinolina para bovinos, cerdos y aves. Se ha establecido una tolerancia mundial en el alimento destinado a animales en un rango de 10 a 600 ppb (Coulombe, 1993).

Control del Crecimiento de los Hongos

Para prevenir o controlar el crecimiento de los hongos se han intentado numerosas estrategias, entre las mas importantes se encuentra la manipulación del hongo mismo o bien de su medio físico, el empleo de fungicidas, el uso de antibióticos, el empleo de mejoramiento genético de las plantas para el control de enfermedades o

bien usando otros microorganismos como medio de control biológico estos métodos comúnmente están relacionados entre si (Deacon, 1988).

La manipulación del medio físico del hongo hace necesario conocer los requerimientos osmóticos, de pH o de temperatura para asegurarse que queden fuera de estos límites, un ejemplo es el secado para conservar materiales como el grano, que debe almacenarse con un contenido de humedad de 13 a 14 por ciento.

Los fungicidas son un grupo de compuestos químicos que destruyen al hongo o inhiben su crecimiento, comprenden una amplia gama de compuestos que resultan adecuados para utilizarse en un conjunto particular de circunstancias, debido a factores como toxicidad de mamíferos, fitotoxicidad o bien olor o color desagradable (Deacon 1988).

El azufre es un fungicida que se usa en forma elemental, o en la de diversos compuestos, en la forma elemental actúa como agente tóxico por la vaporización de sus partículas, al quedar la vaporización en contacto con la espora del hongo previene o inhibe su crecimiento, tal acción se extiende a una distancia corta (1 a 2 mm) y necesita de una distribución uniforme (Giovani, 1968). Para que el azufre ejerza su acción fungicida, es necesario una temperatura superior a los 20°C,

para provocar la emanación de gases sulfurosos, sin los cuales su acción resultaría nula (Juscafresa, 1973).

La prevención de la infección con *Aspergillus* es el mejor método para reducir la incidencia (Coulombe, 1993). Los antibióticos antimicóticos se consideran un grupo especial de fungicidas de alto costo y poca persistencia, su alto grado de selectividad restringe su aplicación a ocasiones específicas. Ciertos inhibidores se han usado en el caso del grano de maíz con un alto contenido de humedad como es el caso de los ácidos orgánicos (propiónico, benzoico, acético, fórmico, sórbico, etc.). El control biológico se define como el uso de un organismo para controlar otro.

Aditivos para Ensilajes

Los aditivos mejoran o preservan la calidad original de los ingredientes evitando su deterioro; los aditivos para ensilajes se clasifican como inhibidores y estimulantes de la fermentación; generalmente favorecen una tasa más rápida de producción de ácido láctico (Avila *et al.*, 1990) en el Cuadro 2.3 se presenta una forma de clasificar los aditivos de acuerdo a su efecto sobre la fermentación.

Los aditivos al ensilado son productos que proveen de nutrientes y mejoran el valor alimenticio de éste; los preservativos en cambio mantienen la calidad. Si se siguen buenas prácticas de manejo se puede lograr un ensilaje de alta calidad, pero algunas veces el material ensilado está muy húmedo o muy seco; no contiene suficientes carbohidratos fermentables; es deficiente en ciertos nutrientes o, si buenas prácticas de manejo no pudieron seguirse, se hace necesario agregar un aditivo o un preservativo; con esto se busca lograr un material que mejore el comportamiento animal y la ganancia neta y no únicamente hacer un ensilaje que se vea o huelga mejor.

Cuadro 2.3 Clasificación de los aditivos comúnmente empleados en los ensilajes

Aditivo	Efecto sobre la Fermentación	
	Inhibidores	Estimulantes
Nutritivo	Acidos orgánicos	NNP
	Propiónico	Amoniaco
	Acético	Urea
	Láctico	Melaza
	Fórmico	Granos
No nutritivo	Acidos minerales	Inoculantes
	Sulfúrico	
	Clorhídrico	
	Fosfórico	
	Fórmico	
	Hidróxido de Sodio	

En orden de efectividad el propósito de agregar un aditivo o preservativo es: agregar nutrientes, proveer carbohidratos fermentables, incrementar las condiciones ácidas, inhibir hongos o bacterias no

deseables, reducir el oxígeno presente y el contenido de humedad y absorber nutrientes que pudieran perderse por escurrimiento (Ensminger *et al.*, 1990).

Los ácidos propiónico, acético, láctico, cítrico y fórmico son poco corrosivos, mejoran la preservación del forraje sin que pierda su aceptabilidad y son inhibidores de hongos; el ácido propiónico ha sido el más utilizado para prevenir la fermentación aeróbica, reduce las pérdidas por fermentación y es utilizado como fuente de energía por parte del animal (Avila *et al.*, 1990). Se recomienda aplicarlos en campo, al cortar o almacenar el forraje, limitando al máximo la presencia de oxígeno, debe prevenirse que se diluyan con agua cubriéndose con materiales plásticos (Ensminger *et al.*, 1990), la aplicación de ácidos se recomienda en un rango de 0.5 a 1 por ciento del peso del material a ensilar. Algunas limitantes del uso de estos materiales son su costo elevado y su distribución, que debe ser uniforme en la cosecha (Seglar, 1997).

La adición de fuentes baratas de nitrógeno no proteico (NNP) como amoníaco y urea incrementan significativamente el valor nutritivo del ensilaje (Santacruz *et al.*, 1982 <http://www.uach.cl>), éste puede ser utilizado por los microorganismos ruminales para producir proteína verdadera en el rumen, la urea (46 por ciento de Nitrógeno) se adiciona a

un nivel de cinco kg por tonelada, base húmeda, o 11.5 por ciento, base seca; aumenta cuatro por ciento la proteína cruda (de 9 a 13) en maíz, tiene efecto amortiguador sobre el pH, hay mayor contenido de ácido láctico debido a una actividad más prolongada de las bacterias lácticas, los hongos son inhibidos por el amoníaco (Avila *et al.*, 1990). El bajo costo del amoníaco, en lugar de la urea, hace que sea el aditivo más atractivo para el ensilaje, además que ejerce acción fungicida y aumenta la concentración de ácido láctico, por prolongar el período de fermentación del material ensilado reduciendo la degradación de la proteína presente (Santacruz *et al.*, 1982).

El amoníaco anhidro actúa como agente buferizante elevando el pH del ensilaje hasta nueve, prolonga el período de fermentación pero reduce el contenido de materia seca, ya que incrementa las pérdidas por fermentación anaeróbica, degrada parcialmente la estructura de la fibra ya que rompe las uniones de la hemicelulosa. Usando urea se reducen las pérdidas de materia seca en un 30 por ciento, ya que se degrada a amoníaco y CO₂. La ventaja más notable es que el pH inactiva las enzimas proteolíticas disminuyendo la degradación de la proteína, los resultados son los mismos que al usar ácidos, pero la acción es opuesta (Seglar, 1997).

En el Cuadro 2.4 se muestra el efecto de la adición de varios niveles de melaza y urea en ensilajes de sorgo forrajero (base seca). Se ha encontrado que el amoníaco funciona mejor como aditivo que la urea y se aplica con más facilidad. La melaza se recomienda cuando se tiene un bajo contenido de carbohidratos solubles, ya que los provee para la producción de ácido láctico, por lo que debe procurarse un mezclado homogéneo (Avila *et al.*, 1990), se mejora la aceptabilidad y el valor nutritivo, es útil en ensilajes muy húmedos, con poco contenido de grano o en forraje muy maduro (Santacruz *et al.*, 1982).

Cuadro 2.4 Efecto de la adición de varios niveles de melaza y urea en ensilajes de sorgo forrajero (base seca).

Melaza (%)	Urea (%)	Materia Seca (%)	Proteína Cruda (%)	Proteína Verdadera (%)	pH
0	0	30.1	7.6	5.7	4.2
0	0.7	28.0	9.0	4.9	4.2
0	1.4	27.5	11.1	5.1	4.2
5	0	30.3	6.4	4.9	3.8
5	0.7	28.9	8.4	4.4	4.2
5	1.4	28.2	10.6	4.6	4.2
10	0	30.4	7.7	4.9	3.8
10	0.7	29.3	8.5	4.4	4.2
10	1.4	29.8	8.4	4.8	4.2

Santacruz *et al.* (1982).

Con el uso del grano se conserva del 75 a 80 por ciento del valor alimenticio del grano, si el aire es excluido; se mejora la aceptabilidad. Cuando el forraje verde se ensila con un apropiado contenido de humedad no ofrece ninguna ventaja el agregar grano (Ensminger *et al.*, 1982).

En el Cuadro 2.4 se muestra el efecto de la adición de varios niveles de melaza y urea en ensilajes de sorgo forrajero (base seca), se ha encontrado que el amoníaco funciona mejor como aditivo que la urea y se aplica con más facilidad. La melaza se recomienda cuando se tenga un bajo contenido de carbohidratos solubles, ya que los provee para la producción de ácido láctico, por lo que debe procurarse un mezclado homogéneo (Avila *et al.*, 1990), se mejora la aceptabilidad y el valor nutritivo, es útil en ensilajes muy húmedos, con poco contenido de grano o en forraje muy maduro (Santacruz *et al.*, 1982).

Cuadro 2.4 Efecto de la adición de varios niveles de melaza y urea en ensilajes de sorgo forrajero (base seca).

Melaza (%)	Urea (%)	Materia Seca (%)	Proteína Cruda (%)	Proteína Verdadera (%)	pH
0	0	30.1	7.6	5.7	4.20
0	0.7	28.0	9.0	4.9	4.38
0	1.4	27.5	11.1	5.1	4.85
0	0	30.3	6.4	4.9	3.90
0	0.7	28.9	8.4	4.4	4.15
0	1.4	28.2	10.6	4.6	4.43
0	0	30.4	7.7	4.9	3.95
0	0.7	29.3	8.5	4.4	4.08
0	1.4	29.8	8.4	4.8	4.12

Santacruz *et al.* (1982).

Con el uso del grano se conserva del 75 a 80 por ciento del valor alimenticio del grano, si el aire es excluido; se mejora la aceptabilidad. Cuando el forraje verde se ensila con un apropiado contenido de humedad no ofrece ninguna ventaja el agregar grano (Ensminger *et al.*,

1990), el grano presenta el inconveniente de ser caro. Otros materiales que se han utilizado con buenos resultados son: la cascara de piña, pulpa de cítricos y suero de leche (Avila *et al.*, 1990).

Se han utilizado ácidos minerales como sulfúrico, clorhídrico y fosfórico para reducir el pH drásticamente e inhibir cualquier crecimiento bacteriano, pero son caros, inhiben la proteólisis y es un problema su aplicación (Avila *et al.*, 1990).

El ácido sulfúrico se aplica con menos dificultad (Sudano, 1979), al utilizar altos niveles de ácido resulta en un efecto residual en el ensilado lo que disminuye el consumo por parte de los animales y en el caso de los rumiantes predispone a acidosis. En un experimento donde se simulaban las condiciones del ensilaje y se cultivaron las bacterias *Clostridium batyricum*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*, la combinación de ácidos minerales y nitrato fue más efectiva al inhibir el crecimiento de microorganismos que utilizando solo ácido o solo nitrato (Sudano, 1979).

El ácido fórmico inhibe parcialmente la fermentación y la acción inicial de las bacterias proteolíticas y productoras de ácido acético y butírico, utilizando 2.7 kg de una solución con 80 por ciento de ácido fórmico por tonelada de forraje fresco (65 por ciento de humedad) las

bacterias lácticas bajan el pH hasta 4, el aditivo debe mezclarse muy bien con el forraje (Avila *et al.*, 1990), es utilizado principalmente en mezclas de pastos ricos en proteínas (Watson y Smith, 1984). El ácido fórmico aplicado a ensilajes de zacate rye grass resulta en altos niveles de carbohidratos solubles, bajo contenido de ácido láctico y una digestibilidad ligeramente superior que el tratamiento control no tratado con ningún aditivo (Smith *et al.*, 1993). Utilizado como esterilizante ocasiona una fermentación reducida, el pH se mantiene alto (5.3) sirve como un protector de la proteína que es utilizada en el intestino delgado, el consumo del ensilaje es mayor, no hay tanta pérdida de materia seca por fermentación; si se aplica en exceso se corre el riesgo de hacer indigestible la proteína (Avila *et al.*, 1990).

Los inoculantes son cultivos deshidratados que deben cumplir con varios preceptos; deben tener una rápida tasa de crecimiento para que dominen sobre los organismos presentes (Raymond *et al.*, 1986), produzcan altas cantidades de ácido láctico rápidamente (Watson y Smith, 1984) y a la vez ser tolerantes a él, no actuar sobre los ácidos orgánicos, fermentar azúcares y tener poca acción proteolítica. Debe tenerse cuidado al adicionar el inoculante en la cantidad adecuada y en forma homogénea, el número de organismos presentes por gramo de forraje fresco es de cien millones aunque es variable, por lo que la cantidad que se adicione deberá ser de mínimo 100,000

microorganismos viables por gramo de forraje verde para que compita adecuadamente con las bacterias presentes. Se busca que las enzimas actúen sobre el almidón y por lo tanto reduzcan el pH, se han utilizado amilasas, celulasas y hemicelulasas. En ensilajes con un alto contenido de humedad se recomienda un inoculante debido a que el agua diluye los ácidos y se requiere mantener las condiciones ácidas, las leguminosas responden favorablemente ya que tienden a amortiguar el pH (Avila *et al.*, 1990).

Las enzimas que se agregan al ensilaje incrementan la disponibilidad del sustrato para que las bacterias ácido lácticas degraden carbohidratos complejos, son recomendables en cultivos altamente buferizados, muchos inoculantes contienen cultivos de bacterias homofermentativas productoras de ácido láctico de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Pediococcus*. La efectividad del inoculante depende de la existencia de microorganismos y de la calidad y cantidad de los microorganismos inoculados (Bjorge, 1996), además la tolerancia de las bacterias a los cambios que van ocurriendo durante el proceso de ensilaje es menor en el género *Streptococcus*, posteriormente se desarrolla *Lactobacillus* y al final los *Pediococcus* que son más tolerantes (Raymond *et al.*, 1986). Los preparados enzimáticos usados como aditivos en los ensilados se obtienen de bacterias como: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus Oryzae*, estos organismos producen varias enzimas

incluyendo celulasas, amilasas y proteasas; en ensilados de zacates, donde los productos de las enzimas han reducido el contenido de fibra y mejorado la fermentación, la magnitud de la mejora en ocasiones no justifica su costo (Seglar, 1997).

Smith *et al.* (1993) prepararon tres ensilajes con rye grass perenne uno se trato con un inoculante enzimático (a base de *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecium* y *Pediococcus acidilactici*), otro con ácido fórmico y un tercero al que no se le aplicó ningún aditivo, los resultados a la aplicación del inóculo fueron: un alto nivel de ácido láctico y bajo de azúcares residuales así como un aumento en la digestibilidad del ensilaje.

En un estudio con alfalfa en silos plásticos, donde se utilizó un aditivo a base de bacterias; se observó una fermentación homoláctica y una disminución de pH más rápida por el aumento de ácido láctico, el agregar bacterias ácido lácticas aumento la digestión de la fibra y mejoró la fermentación al disminuir el pH drásticamente, también la digestión *in vitro* de la fibra en detergente neutro se disminuyó, lo que se atribuyó a que las enzimas hidrolizaron más rápidamente la porción digestible del forraje (Sheperd *et al.*, 1995).

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del Área de Estudio

En el presente trabajo se utilizó zacate rye grass (*Lolium multiflorum* Lam) cultivado en praderas de riego en el Municipio de Parras de la Fuente, Coahuila, cuyas coordenadas geográficas son: 25°27' latitud norte, 102°11' longitud oeste, a una altura de 1500 msnm y una precipitación media anual de 519 mm. El Clima se clasifica como *Msohx'* (*w*)(*e*), que corresponde a un clima seco, semiárido con lluvias intermedias en verano e invierno, con una temperatura media anual extremosa entre 7 y 14°C (García, 1987); los muestreos y análisis de laboratorio se efectuaron en la Unidad Metabólica y Laboratorio de Nutrición y Alimentos de la UAAAN.

Cultivo del Hongo

El cultivo de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UA de C, donde se proporcionó la cepa y se aisló en cajas petri, previamente esterilizadas en autoclave. Las cajas

contenían agar de dextrosa saboured. En frascos de un litro de capacidad se agregó agua destilada y se disolvió el agar de dextrosa a razón de 30 g por litro de agua, los frascos contenían 600 ml de agua. Se esterilizaron y permanecieron a temperatura ambiente hasta que solidificó el agar, una vez solidificado se inocularon con una suspensión de esporas de *A. flavus* y *A. niger* y se incubaron a temperatura ambiente por 15 días. En un frasco de vidrio se concentró la biomasa de la que se tomó una muestra y se determinó el número de esporas viables al microscopio por medio de la técnica de la cámara de New Bawell.

Materiales Utilizados

La pradera de zacate rye grass (*Lolium multiflorum* Lam) sujeta a experimentación lleva establecida 2 años; el corte del zacate se efectuó el día 27 de abril de 1999; una vez cortado se alomilló para exponerlo a la luz solar, se monitoreó constantemente hasta que se alcanzó un contenido de 60 por ciento de materia seca parcial, momento en que fué empacado para su posterior ensilaje.

Se utilizaron 160 microsilos de bolsas plásticas de 23 kg de peso promedio para someterse a un proceso de fermentación de 60 días.

Descripción de los Tratamientos

El azufre se aplicó 15 días antes del corte cuando la planta aun se contraba en pié el cuál fue asperjado al cultivo en el riego por medio pivote central en dosis de 30 kg/ha. La literatura especula con respecto al modo de acción de los fungicidas a base de azufre, el azufre ponerse en contacto con las esporas fungosas es reducido a sulfuro hidrogeno el cuál es tóxico para éstas, las esporas absorben grandes cantidades de azufre y debido a su gran poder reductor interfiere en la drogenación vital y las reacciones de hidrogenación dentro de la célula ngosa, en los hongos ricos en lípidos como los mildius polvorientos tienen mas azufre que otros tipos de microorganismos (Cremlyn, 95).

El inhibidor a base de ácido propiónico es un aditivo nutritivo inhibidor de la fermentación a una concentración de 63 por ciento, se utiliza con la finalidad de inhibir el crecimiento de microorganismos leseables como hongos y *Clostridias* en la capa superficial de los silados. la cantidad de inhibidor de hongos a base de ácido propiónico¹ aplicada fue de 70 ml.

El tratamiento a base del inoculante bacteriano² para silos es un estimulante de la fermentación, elaborado a base de tres bacterias productoras de ácido láctico (*Streptococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*) y cuatro enzimas (celulasas, hemicelulasas, amilasas y pentosanasas) la finalidad de utilizar enzimas es de hacer mas disponibles los carbohidratos presentes en el forraje para las bacterias; el inoculante también incluye un agente microencapsulante que mantiene viables las bacterias (Diego, 1998), la cantidad de inoculante aplicado fue de 6 ml en los tratamientos respectivos, los cuales se disolvieron en agua destilada tibia para su aplicación por medio de aspersión.

Diseño de los Tratamientos

En el Cuadro 3.2 se describe el diseño de los tratamientos, el primer factor corresponde a la aplicación de azufre con los niveles 0 y 1 (nivel mas bajo y mas alto respectivamente), el segundo a la inoculación de *Aspergillus* con los niveles 0 y 1 (nivel mas bajo y mas alto respectivamente) y el tercero correspondiente a la aplicación de aditivo con cuatro niveles (sin aditivo, con inoculante, con inhibidor y la combinación inoculante-inhibidor). De las 160 bolsas a la mitad se le

² SILL ALL[®] ALL-TECH

aplico ácido sulfúrico, estas 80 a su vez se dividieron en dos y en ambos casos se inoculó hongo en 40, la cantidad de hongo inoculado en los tratamientos respectivos fue de 20 cm³, estas 40 a su vez se dividieron en 20 para aplicar el inhibidor de hongos, el inoculante bacteriano y la combinación de inhibidor mas inoculante.

Cuadro 3.1 Diseño de los tratamientos que corresponden a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 X 2 X 4

Azufre	Inoculación con <i>Aspergillus</i>	Aditivos	Tratamiento
0	0	1	1
		2	2
		3	3
		4	4
	1	1	5
		2	6
		3	7
		4	8
1	0	1	9
		2	10
		3	11
		4	12
	1	1	13
		2	14
		3	15
		4	16

⁰ Corresponde a no aplicación del producto

¹ Corresponde a aplicación del producto en las cantidades mencionadas anteriormente

ADITIVOS

¹ Sin aditivo

² Inhibidor

³ Inoculante

⁴ Combinación (Inhibidor y Inoculante)

Análisis de Laboratorio y Variables Evaluadas

Las bolsas de cada tratamiento fueron abiertas los días 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 a partir del día en que fueron selladas y que iniciaron el proceso de fermentación.

Se monitoreó la temperatura en el ensilado dentro de cada bolsa plástica por medio de un termómetro, se tomaron muestras de zacate en bolsas de polietileno y se llevaron al laboratorio donde cinco gramos de forraje fueron diluidos en 100 ml de agua y licuados para la lectura del pH por medio de un potenciómetro.

El resto de las muestras de forraje se colocaron en la estufa de aire forzado a una temperatura de 60°C para ser secadas y determinar su contenido de materia seca parcial. Una vez secas se molieron en un molino de cuchillas con criba de un milímetro; la cantidad de materia seca, fibra cruda, proteína cruda, cenizas, extracto etéreo, se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por la Association of Official Analytical Chemist (1980), extracto libre de nitrógeno y total de nutrientes digestibles se calculó de acuerdo al procedimiento sugerido por Crampton y Harris (1974).

Las variables medidas y posteriormente analizadas en el presente trabajo fueron persistencia de aparición de hongo, potencial hidrógeno, temperatura, materia seca, cenizas, extracto etéreo, fibra cruda, proteína cruda, extracto libre de nitrógeno y total de nutrientes digestibles.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Los datos de las variables obtenidas al día 45 (64 unidades experimentales) se analizaron por medio de un diseño completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 2 \times 4$ donde A corresponde a la aplicación de azufre, B a la inoculación de hongo y C a la aplicación de los distintos aditivos (1 sin aditivo, 2 inhibidor a base de ácido propiónico, 3 inoculación de bacterias acidolácticas y 4 combinación) con cuatro repeticiones (la variable persistencia fue analizada como una variable categórica), los datos de los siete muestreos se sometieron a regresión para observar la tendencia y a un análisis multivariado por el método de componentes principales.

RESULTADOS

Análisis de las Variables al día 45

El análisis de las variables al día 45 muestra diferencia altamente significativa ($P < .01$) en la respuesta de las variables persistencia (P) y cenizas (C) al aditivo, de la temperatura (T) al inóculo y del extracto etéreo (EE) al azufre. Respuesta significativa ($P < .05$) se observó en P a la interacción inóculo-azufre, en C para inóculo, de extracto libre de nitrógeno (ELN) para azufre y aditivo y en proteína cruda (PC) para azufre. El resto de las variables potencial Hidrógeno (pH), materia seca (MS), fibra cruda (FC) y total de nutrientes digestibles (TND) no muestran diferencia significativa ($P > .05$) a los factores ni a sus interacciones.

Persistencia de hongos

La respuesta de la variable persistencia resultó altamente significativa ($P < .01$) de acuerdo al aditivo que se aplicó y significativa ($P < .05$) a la interacción inóculo-azufre. La posibilidad de respuesta

Cuadro 4.1 Probabilidad de respuesta (presencia o ausencia) de acuerdo al aditivo que contiene el tratamiento

TRATAMIENTO	ADITIVO	PRESENCIA (%)	AUSENCIA (%)
1	Sin aditivo	75	25
2	Inhibidor	0	100
3	Inoculante	50	50
4	Combinación	0	100
5	Sin aditivo	100	0
6	Inhibidor	25	75
7	Inoculante	75	25
8	Combinación	25	75
9	Sin aditivo	100	0
10	Inhibidor	50	50
11	Inoculante	100	0
12	Combinación	25	75
13	Sin aditivo	75	25
14	Inhibidor	0	100
15	Inoculante	100	0
16	Combinación	25	75

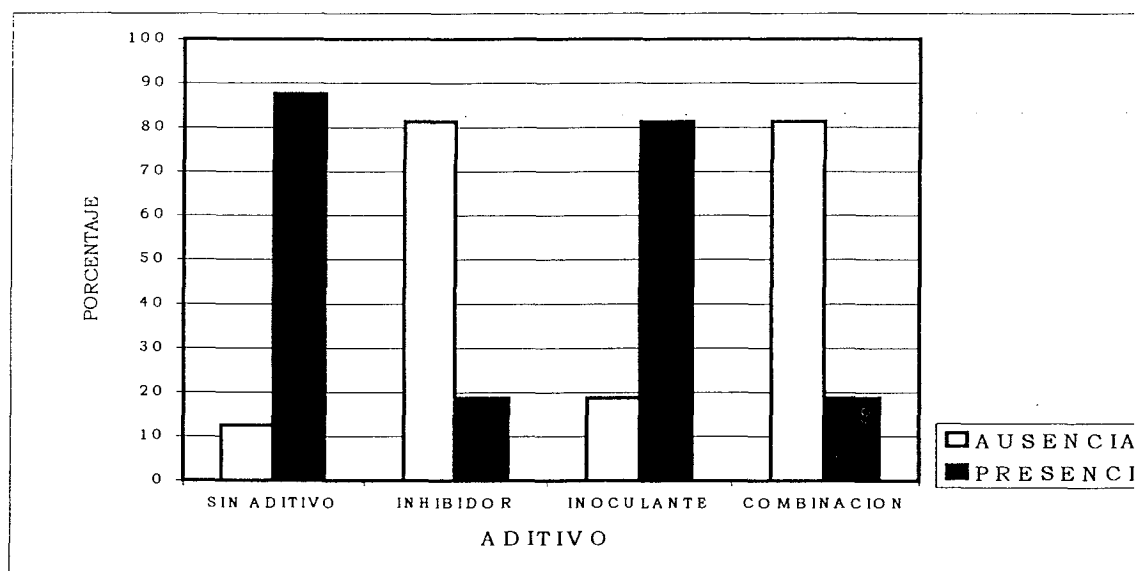


Figura 4.1 Persistencia de aparición de hongo filamentoso de acuerdo al aditivo aplicado al día 45 de iniciado el proceso de fermentación.

(Cuadro y Figura 4.1), considerando la prueba categórica de Chi-cuadrada, nos indica que en los tratamientos donde se aplicó inhibidor (IAP)(tratamientos 2, 6, 10 y 14) y la combinación de inhibidor mas inoculante (COMB) (tratamientos 4, 8, 12 y 16) es donde se observa que hay menor persistencia de hongos en los microensilados al momento de abrir la bolsa.

Potencial Hidrógeno

No se observó respuesta de la variable pH a los tratamientos ya que tendió a mantenerse constante como se observa en el Cuadro 4.2 que muestra las medias de tratamiento al día 45 de iniciado el proceso de fermentación.

Cuadro 4.2 Promedio de pH de los tratamientos observados al día 45 de iniciado el proceso de fermentación.

	TRATAMIENTOS															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
pH	6.3	6.3	6.2	6.1	6.1	6.1	6.2	6.1	6.1	6.0	6.3	6.1	6.1	6.2	6.1	6.1

Temperatura y Materia Seca

La variable temperatura mostró respuesta significativa ($P < .05$) a el nóculo, es decir la temperatura del ensilado fue mayor cuando no se inoculó el hongo (25.8°C) que cuando se hizo (25.3°C), y no se observó

respuesta a la aplicación de azufre o al aditivo. En el caso de la MS no se obtuvo respuesta de esta variable a ninguno de los factores ni a las interacciones que integran los tratamientos.

Cenizas

El contenido de cenizas se vio afectado por el aditivo ($P < .01$) y por la inoculación con *Aspergillus* ($P < .05$). La prueba de medias indica que el aditivo con inoculante (IAB) tiene efecto aumentando el contenido de cenizas, ya que éste es mayor con este aditivo (Cuadro 4.3) seguido de IAP y COMB; el menor contenido de cenizas se presenta en el tratamiento donde no se aplicó ningún aditivo (Figura 4.2) en cambio es mayor cuando no se inocula hongo y a la aplicación de azufre no se observa respuesta.

Cuadro 4.3 Cuadro de comparación de medias para la variable cenizas.

Aditivo	n	Media	Tukey
Inoculante	16	8.56	a
Inhibidor	16	8.01	ab
Combinación	16	7.97	ab
Sin aditivo	16	7.29	b

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

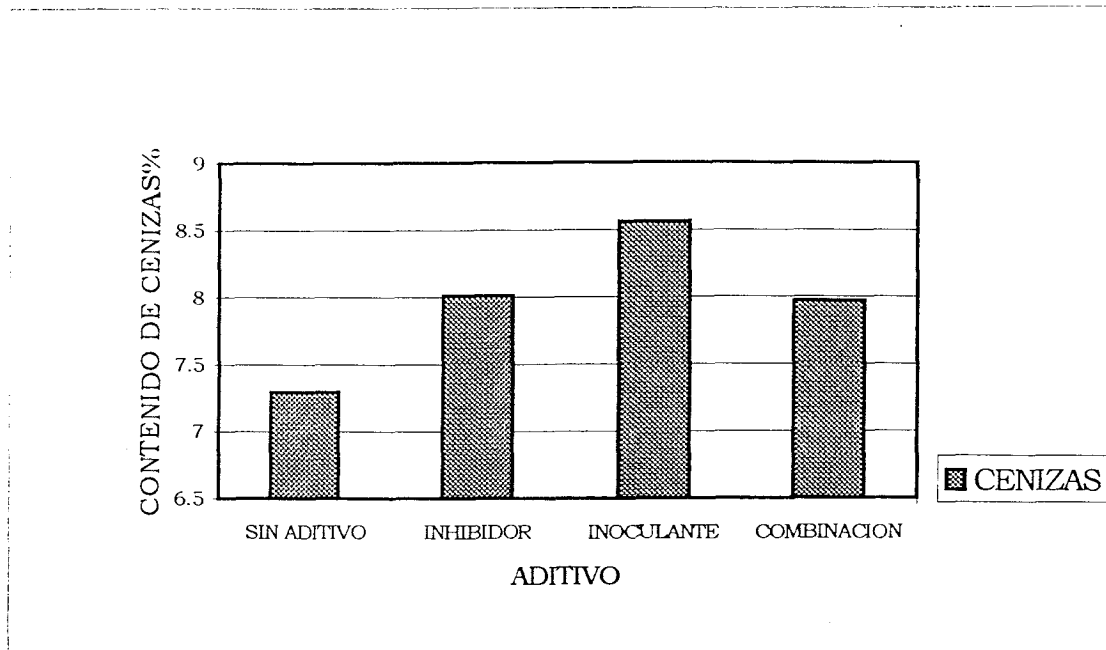


Figura 4.2. Contenido de cenizas promedio de acuerdo al aditivo aplicado al día 45 de iniciado el proceso de fermentación.

Extracto Etéreo

La variable EE muestra respuesta significativa ($P < .05$) a la aplicación de azufre, ya que se obtuvieron valores donde el contenido de EE fue mayor cuando no se aplicó azufre que con la aplicación de éste (3.27 vs 3.22 por ciento respectivamente), también el contenido de EE fue mayor cuando se aplicó IAB (3.33 por ciento), seguido de la COMB (3.22 por ciento), el IAP (3.04 por ciento) y el menor contenido lo mostró el tratamiento control (2.99 por ciento).

Proteína Cruda

Para la variable PC se observó significancia ($P < .05$) a la aplicación de azufre, es mayor el contenido de PC cuando no se aplica azufre (12.9 vs 11.45 por ciento); con respecto a los distintos aditivos la respuesta no es significativa ($P < .05$) sin embargo se observa el mayor contenido de PC con el aditivo IAB (12.27 por ciento) y el menor con los tratamientos sin aditivo (11.15 por ciento).

Fibra Cruda

Esta variable no muestra respuesta significativa ($P > .05$) a ninguno de los factores ni las interacciones que integran los tratamientos, numéricamente se observa que es mayor el contenido de fibra cuando se inocula (27.74 y 27.11 por ciento respectivamente), así como en el tratamiento que no lleva ningún aditivo (27.55 por ciento sin aditivo contra 27.23 IAP).

Extracto Libre de Nitrógeno

Hay significancia para esta variable a la aplicación de azufre y al aditivo, el contenido de ELN es mayor cuando se aplica azufre (50.23 contra 48.98 por ciento); con respecto al aditivo los tratamientos a los

que no se les aplicó aditivo tienen el mayor contenido de ELN (50.99 por ciento), los tratamientos a base del IAP y la COMB son iguales (49.80 y 49.05 por ciento) y el que contiene IAB muestra el contenido menor (48.57 por ciento).

Total de Nutrientes Digestibles

No se encontró respuesta de esta variable ($P > .05$) a los tratamientos probados, aplicación de azufre, inoculación de hongo o aditivos evaluados.

Análisis de las Variables Durante los Eventos de Muestreo

A continuación se reportan las Figuras de las variables que mostraron los mayores coeficientes de correlación durante los siete eventos de muestreo que se iniciaron el día 30 y se efectuaron cada 5 días hasta el día 60 de selladas las bolsas.

Persistencia

Los resultados del monitoreo en los diferentes eventos nos muestran una correlación positiva de la respuesta de la persistencia del hongo de acuerdo al aditivo que fue aplicado ($r=0.44$)(Figura 4.3).

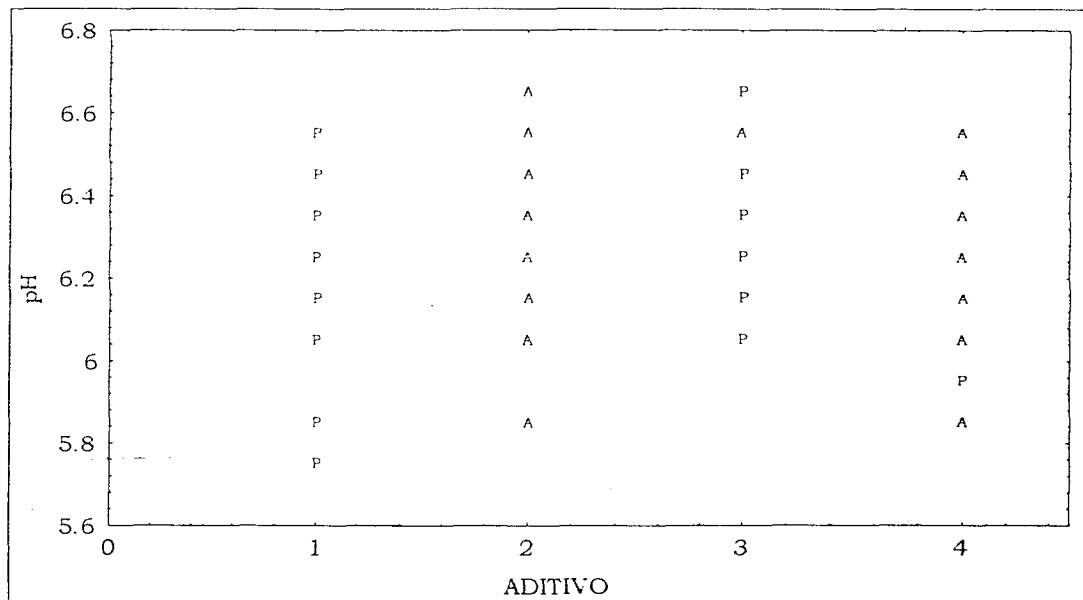


Figura 4.3 Persistencia de aparición de hongos filamentosos de acuerdo al aditivo aplicado y al valor del pH prevaeciente, (1 sin aditivo; 2 Inhibidor a base de ácido propiónico; 3 Inoculante a base de bacterias; 4 Combinación).

Potencial Hidrogeno

El pH fue fluctuante a través de los diferentes eventos de muestreo, (Cuadro 4.4) sin mostrar una tendencia definida en los diferentes tratamientos conforme avanza el periodo de fermentación; ya que no se observa una tendencia a disminuir el pH, éste no es lo suficientemente bajo para alcanzar la fase anaeróbica y posteriormente estable del ensilaje.

Cuadro 4.4. Valores promedio de pH en los diferentes tratamientos conforme avanzó el periodo de fermentación.

TRATAMIENTO	DIAS DE FERMENTACION						
	30	35	40	45	50	55	60
1	6.3	6.2	6.2	6.3	6.4	6.4	6.4
2	6.3	6.6	6.3	6.3	6.2	6.2	6.3
3	6.2	6.4	6.3	6.2	6.3	6.4	6.4
4	6.1	6.3	6.2	6.1	6.0	6.3	6.0
5	6.2	6.5	6.4	6.1	6.3	6.4	6.0
6	6.2	6.2	6.0	6.1	6.0	6.3	6.2
7	6.2	6.4	6.3	6.2	6.3	6.4	6.3
8	6.0	6.1	6.4	6.1	6.2	6.2	6.2
9	6.4	6.2	6.3	6.1	6.5	6.5	6.1
10	6.3	6.1	6.2	6.0	6.2	6.3	6.2
11	6.5	6.4	6.4	6.3	6.4	6.5	6.5
12	6.3	6.2	6.1	6.1	6.3	6.3	6.2
13	6.3	6.2	6.3	6.1	6.3	6.3	6.4
14	6.5	6.2	6.4	6.2	6.0	6.1	6.0
15	6.4	6.4	6.4	6.1	6.3	6.5	6.4
16	6.5	6.3	6.4	6.1	6.0	6.4	6.0

Temperatura y Materia Seca

Se observó que conforme aumentaba la temperatura el contenido de MS se vio disminuido ($r=-0.38$). Conforme avanzaron los eventos de muestreo el contenido de MS se fue incrementando ($r=0.42$), la relación entre el contenido de MS y C fue positiva ($r=0.42$), en cambio entre MS y FC fue negativa ($r=-0.36$) debido que a mayores contenidos de MS los valores de FC se vieron disminuidos.

12029

Cenizas

En la Figura 4.4 se puede observar que los tratamientos con el aditivo IAB tuvieron el contenido más alto de C. El contenido de C a través de los diferentes eventos de muestreo muestra una relación positiva con el contenido de PC ($r=0.61$) (Figura 4.5) y negativa con el ELN ($r=-0.73$) (Figura 4.6).

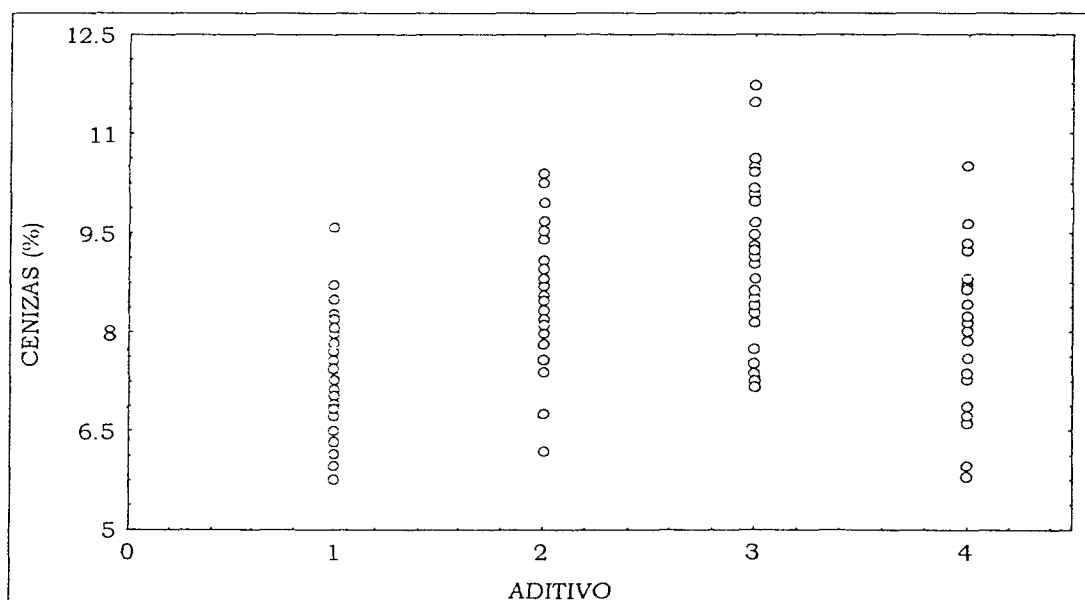


Figura 4.4 Relación del contenido de cenizas de acuerdo al aditivo aplicado (1 sin aditivo; 2 Inhibidor a base de ácido propiónico; 3 Inoculante a base de bacterias; 4 Combinación).

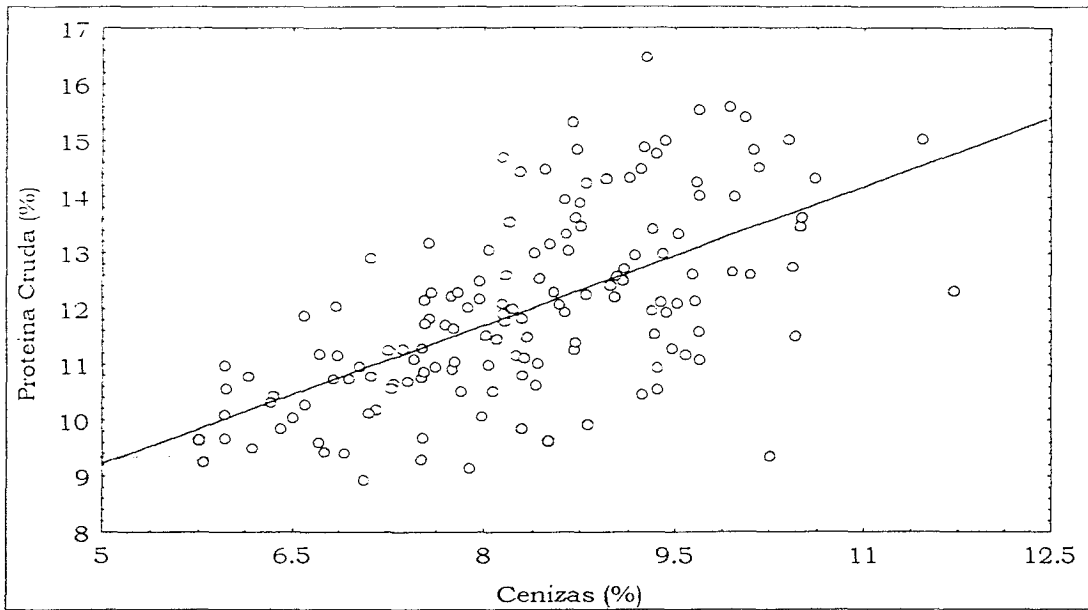


Figura 4.5 Distribución de las observaciones del contenido de proteína cruda del zacate rye grass durante los eventos de muestreo en relación al contenido de proteína cenizas.

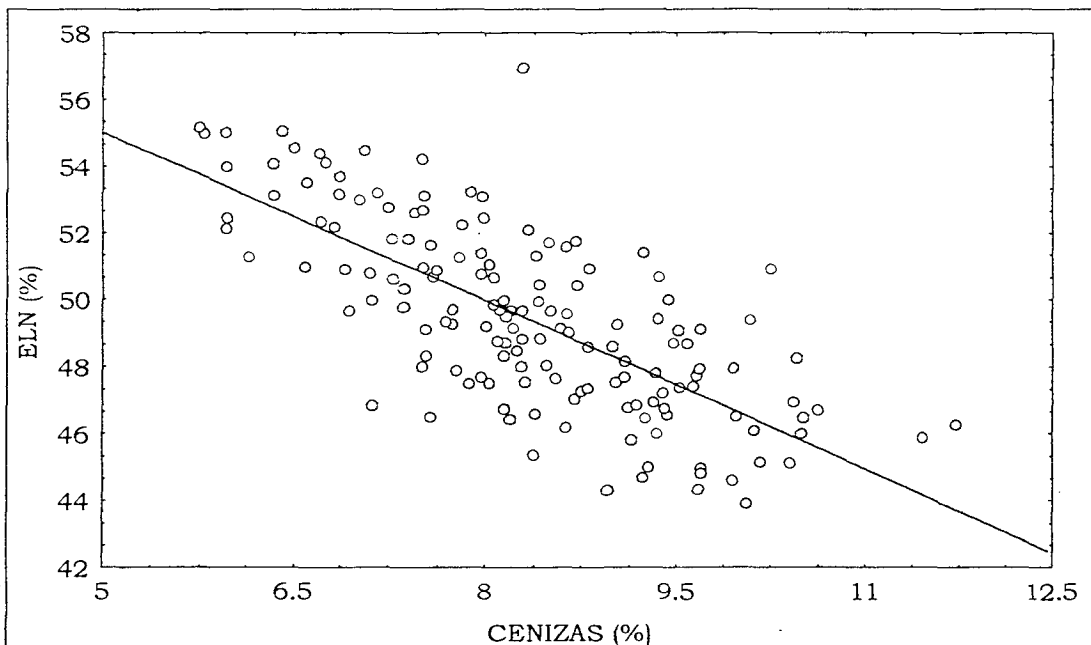


Figura 4.6 Distribución de las observaciones del contenido de extracto libre de nitrógeno durante los eventos de muestreo en relación al contenido de cenizas.

Extracto Etéreo

Considerando los siete eventos de muestreo, al relacionar el contenido de EE se observa una relación positiva ($r=0.62$) con el contenido de PC y negativa con el ELN (-0.55) (Figuras 4.7 y 4.8).

Extracto Libre de Nitrógeno

La relación de la variable ELN a través de las diferentes fechas de muestreo con el aditivo aplicado ($r=-0.32$) se muestra en la Figura 4.9, donde se puede observar que los mayores contenidos de ELN corresponden a los tratamientos donde no se aplicó ningún aditivo y con COMB, seguido de IAP, los tratamientos con el aditivo IAB muestran el menor contenido.

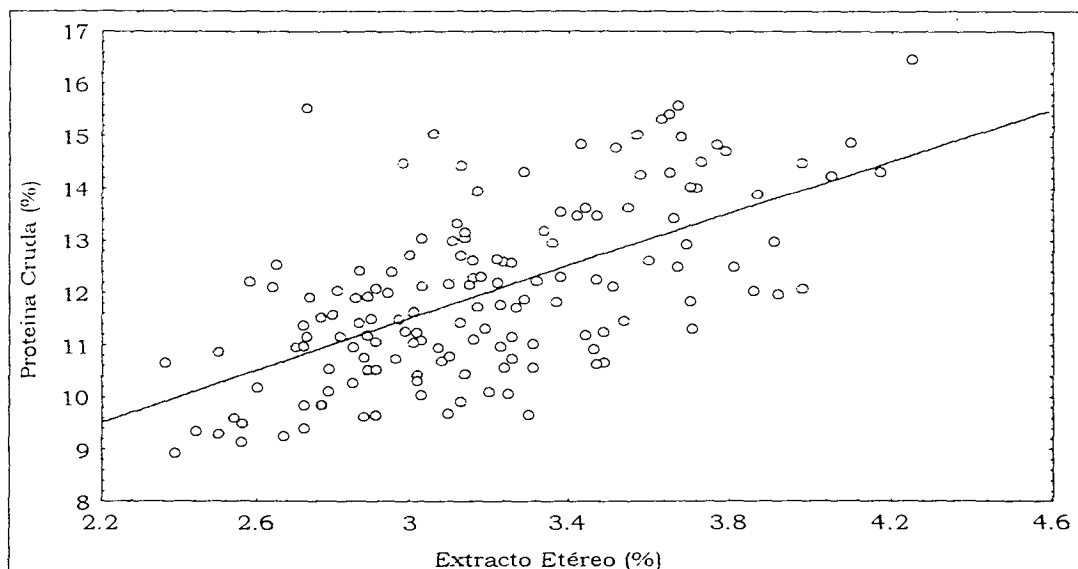


Figura 4.7 Distribución de las observaciones del contenido de proteína cruda del zacate rye grass durante los eventos de muestreo en relación al contenido de extracto etéreo.

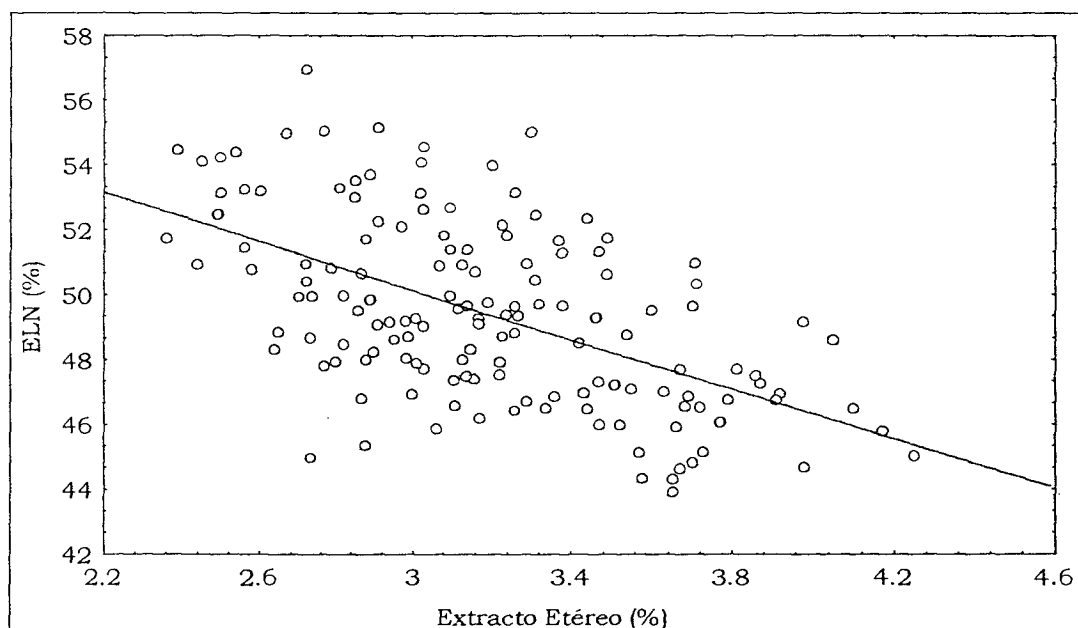


Figura 4.8 Distribución de las observaciones del contenido de extracto libre de nitrógeno del zacate rye grass durante los eventos de muestreo en relación al contenido de extracto etéreo.

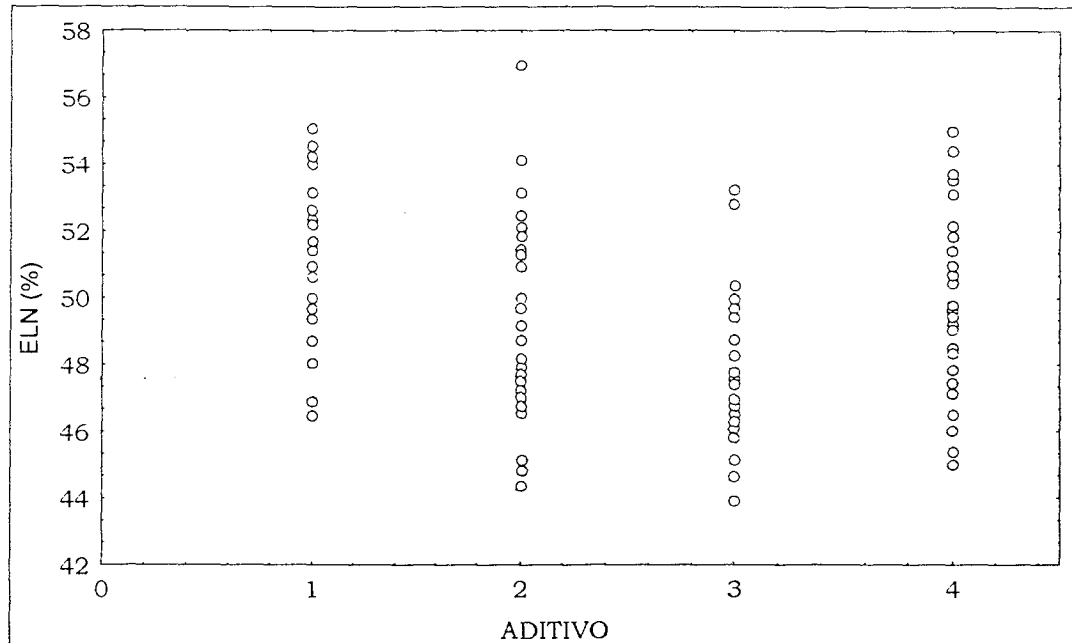


Figura 4.9 Relación entre el contenido de Extracto Libre de Nitrógeno y los aditivos aplicados (1 sin aditivo; 2 Inhibidor a base de ácido propiónico; 3 Inoculante a base de bacterias; 4 Combinación).

Análisis Multivariado

El análisis por medio de componentes principales muestra la relación existente entre las variables, el Cuadro 4.5 muestra los eigenvalores, los componentes y el porcentaje de la variable explicada, los cuales nos indican que con 3 componentes se explica el 52.05 por ciento de la varianza total. En el Cuadro 4.6 se puede observar la relación de las variables dentro de cada componente; en el componente uno (CP1) la variable ELN se relaciona positivamente con el componente

y negativamente con las variables C, EE y PC (Figura 4.10); en el componente dos (CP2) la variable MS se relaciona negativamente con el componente y contraria a la variable T (Figura 4.11) y en el tercer componente (CP3) aditivo y persistencia se relacionan positivamente entre si y son negativas con el componente (Figura 4.12).

Cuadro 4.5 Eigenvalores y porcentaje de la varianza explicada.

COMPONENTE	COEF. DE CORRELACION	% DE LA VARIANZA TOTAL	CORRELACION ACUMULADA	PORCENTAJE ACUMULADO
1	3.19	24.59	3.19	24.59
2	2.04	15.75	5.24	40.35
3	1.52	11.70	6.76	52.05

Cuadro 4.6 Factores de carga que muestran la relación de las variables dentro de cada componente

VARIABLE	CP1	CP2	CP3
Azufre	0.5489	0.0308	-0.2301
Inoculación	0.0202	0.0427	0.0503
Aditivo	-0.2194	-0.0038	-0.7928*
PH	-0.1439	-0.0174	0.2956
Temperatura	0.0362	0.6249*	0.0554
Persistencia	-0.0067	-0.0066	-0.8159*
MS	0.0942	-0.8061*	0.0098
Cenizas	-0.6318*	-0.4678	-0.3242
EE	-0.7599*	0.3634	0.0139
FC	0.0710	0.0337	-0.0038
PC	-0.8956*	-0.0033	-0.1655
ELN	0.8682*	0.1336	0.2385

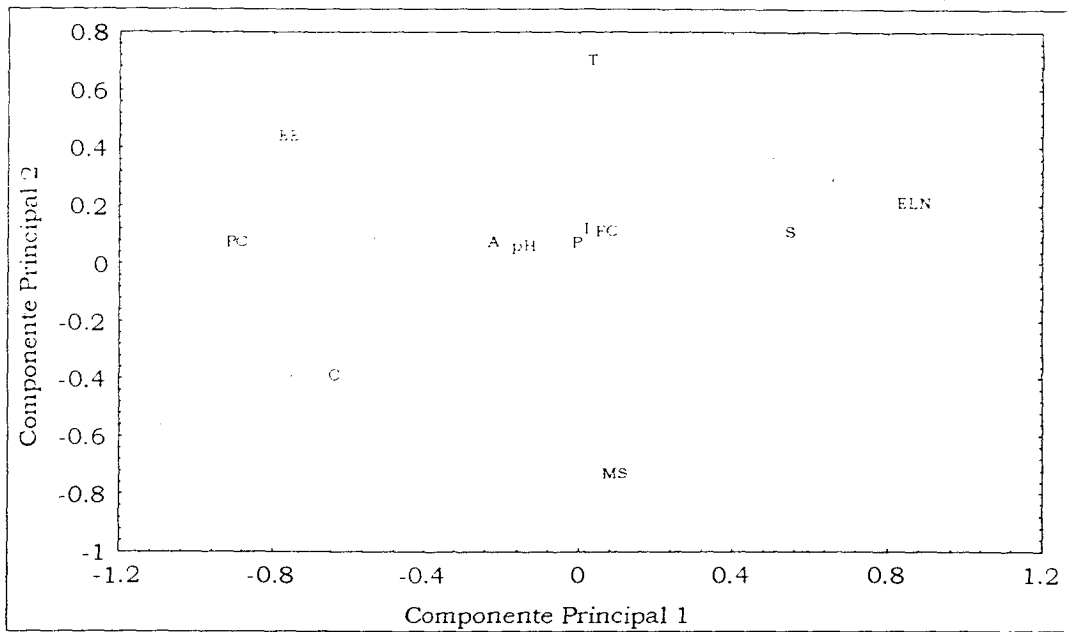


Figura 4.10 Relación entre los componentes principales 1 y 2.

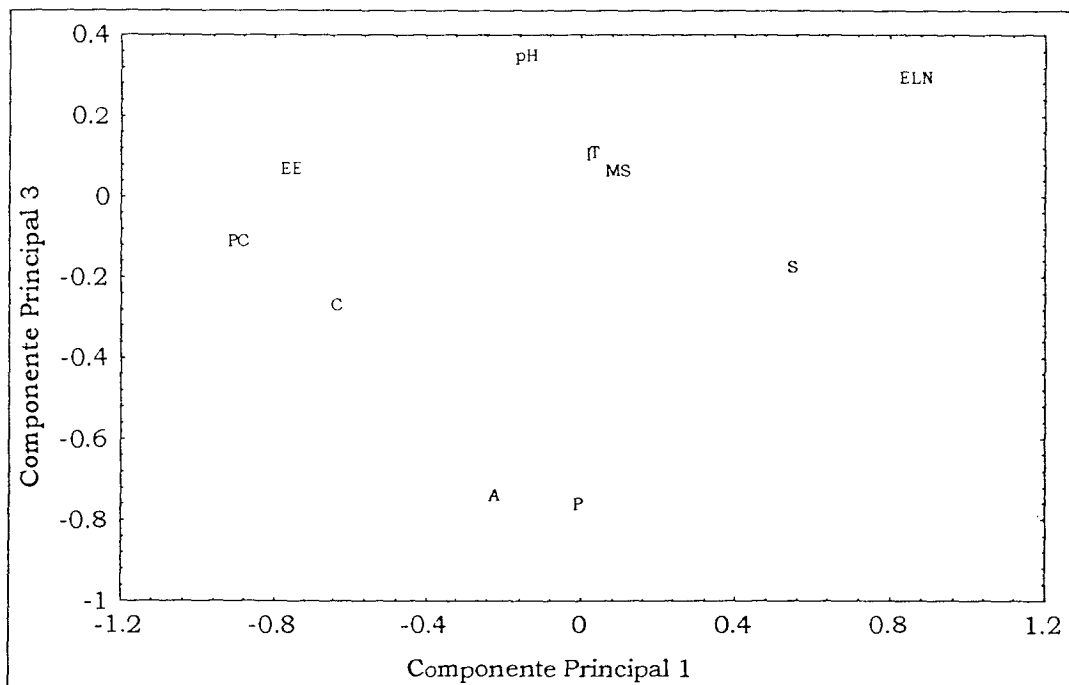


Figura 4.11 Relación entre los componentes principales 1 y 3.

DISCUSIONES

Análisis de las Variables al día 45 y durante los Eventos de Muestreo

Persistencia del Hongo

La respuesta significativa del inhibidor y de la combinación inhibidor mas inoculante para combatir la persistencia de hongos filamentosos coincide con lo reportado por Church (1991) donde el inhibidor disminuye el crecimiento de hongos y reduce el calentamiento causado por la fermentación (Church y Pond, 1992), en el trabajo de Weinberg *et al.* (1993) los aditivos disminuyen la actividad microbial indeseable y reducen el deterioro.

Chen *et al.* (1994) en cambio observaron mejor respuesta con inoculantes a diferencia del presente trabajo. Yan *et al.* (1998) ensilando zacate encontraron un efecto mínimo del inoculante sobre las principales características de la fermentación.

Potencial Hidrógeno

El pH monitoreado en el presente trabajo fue constante a través de los eventos de muestreo, además de no mostrar respuesta a los diferentes tratamientos aplicados, lo que difiere a lo reportado en el trabajo de Kung *et al.* (1987) donde tuvieron pequeñas disminuciones de pH en los silos tratados, en cambio Lunden-Peterson y Lindgren (1990), Smith *et al.* (1993) y Yan *et al.* (1998) tuvieron marcadas disminuciones de pH al agregar inoculantes bacterianos, Weinberg *et al.* (1993) por su parte al agregar un inoculante no observaron reducciones en el pH, pero al combinarlo con enzimas fue efectivo al respecto, resultados similares reportan Fredeen y McQueen (1993) en alfalfa y gramíneas ensilados con contenidos de MS de 40 por ciento promedio.

Narasimhalu *et al.* (1992) no observaron efecto de sus tratamientos (inhibidor e inoculante) en ensilados de timothy (*Plehum pratense*). Los valores reportados en el presente trabajo coinciden con los de I.Selmer-Olsen *et al.* (1993) al momento de ensilar para el zacate rye grass, pese a que tuvieron un contenido de 20.1 por ciento de materia seca, a los 60 días los valores en el pH han disminuido hasta 3 unidades manteniéndose así hasta el día 116.

Temperatura

Los monitoreos de la temperatura se iniciaron a partir del día 30 de sellada la bolsa e iniciado el proceso de fermentación por lo que no se pudo apreciar las fluctuaciones en la temperatura características de la fermentación en los primeros 21 días. Debido al tamaño de partícula y contenido de humedad, en el material ensilado fue difícil lograr un compactamiento total, y no se logró la fase estable del ensilaje donde prevalecen las condiciones anaeróbicas, varios laboratorios (Church, 1991) reportan que en henilajes (zacates de baja humedad o ensilajes de zacates y leguminosas) son frecuentemente más dañados por el calor.

En ensilados de alfalfa y gramíneas (Fredeen y McQueen, 1993) los promedios de temperatura del día 1 al 26 siguen un patrón normal y no sobrepasan 40°C indicando una fermentación favorable .

Materia Seca

No se observó respuesta de la variable materia seca a ninguno de los tratamientos aplicados, así como tampoco durante los diferentes eventos de muestreo. Keady y Steen (1994) en zacate rye grass con un bajo contenido de materia seca y carbohidratos solubles al tratarlo con un inoculante enzimático observaron un efecto benéfico sobre la

fermentación del material ensilado sin modificaciones al contenido de materia seca y Chen *et al* (1994) después de ensilar tanto su control como el tratamiento tuvieron un contenido de materia seca menor que del forraje al momento de ensilar.

El trabajo de Lunden-Peterson y Lindgren (1990) muestra que el sustrato disponible y la cantidad de materia seca tuvieron mayor influencia sobre la calidad del ensilaje que los aditivos que se aplicaron. Los ensilajes con un bajo contenido de humedad tienden a ser menos estables a las condiciones aeróbicas debido a la falta de acidez y gran concentración de acetato residual (Kung *et al.*, 1987).

Cenizas

Los tratamientos a los que se les aplicó el inoculante fueron los que presentaron mayor contenido de cenizas lo cual pudo deberse a la multiplicación de la población bacteriana (exponencial) lo que implicó un incremento en la cantidad de constituyentes y estructuras celulares (Brock, 1978; Preston y Leng, 1989) como macro y microminerales, las bacterias tienen la capacidad de extraer y concentrar minerales esenciales y ante la deficiencia de estos nutrientes reducen la eficiencia en su crecimiento (Brock, 1978; Leng, 1990), al completar su ciclo de

vida las bacterias mueren y sus constituyentes minerales contribuyen al contenido de cenizas del material ensilado.

Keady y Steen (1994) reportan un contenido de cenizas en el forraje mayor en el tratamiento control y menor el tratado con un inoculante enzimático a diferencia del presente trabajo.

Keady *et al.* (1994), utilizando tres tratamientos (control, ácido fórmico e inoculante bacteriano) tuvieron contenidos de cenizas al momento de ensilar de 12, 12.1 y 12.8 por ciento respectivamente. En los tratamientos de Anderson *et al.* (1989), el contenido de cenizas al momento de ensilar se ve incrementado con el proceso de ensilaje.

Extracto Etéreo y Proteína Cruda

Las plantas tienen una composición relativa de proteínas de moderada a baja (Church y Pond, 1992), en el presente trabajo se observan incrementos en el contenido de EE y PC lo que se asocia negativamente con el contenido de ELN que se explicara posteriormente. En el trabajo de Keady *et al.* (1994) el contenido de PC al momento de ensilar se disminuyó después de ensilaje.

Fibra Cruda

El contenido de fibra cruda no se vio disminuido posterior proceso de ensilaje con ninguno de los tratamientos aplicados, trabajos como los de I.Selmer-Olsen *et al.* (1993); Yan *et al.* (1998) Chen *et al.* (1994) en los que aplicaron inoculantes, los azúcares que conforman los carbohidratos estructurales de las plantas fueron liberados y constituyeron un sustrato para la fermentación de microflora del silo que se reflejó en disminuciones del contenido de fibra (fibra en detergente neutro y fibra en detergente ácido) posterior proceso de ensilaje.

Extracto Libre de Nitrógeno

El ELN es un dato que se obtiene por diferencia y es representado por los glúcidos altamente solubles o disponibles, esta es la razón de que incrementos en los contenidos de EE y PC se van reflejar en disminuciones del valor del ELN, al haber más proteína y grasas se disminuyen los carbohidratos solubles, los resultados obtenidos en el presente trabajo donde los mayores contenidos de ELN se encuentran en los tratamientos donde no se aplicó ningún aditivo difieren a los resultados reportados por I.Selmer-Olsen *et al.* (1993) Yan *et al.* (1998) y Chen *et al.* (1994) donde los aditivos bacterianos

enzimáticos muestran efecto positivo sobre los carbohidratos estructurales apoyando el proceso de fermentación del ensilaje, si en el presente trabajo esto sucedió, los carbohidratos solubles por alta disponibilidad pudieron haber sido metabolizados a ácido láctico (Church y Pond, 1992) lo que ocasionó que no se pudieran cuantificar en el presente trabajo. Keady *et al.* (1994) observaron que el contenido de carbohidratos solubles se incrementó posterior al proceso de ensilaje, mayormente donde se aplicó ácido fórmico.

Análisis Multivariado

Los resultados del análisis multivariado muestran el primer componente principal uno que los incrementos en el contenido de extracto etéreo, proteína cruda y cenizas disminuyen el contenido de extracto libre de nitrógeno, como se explicó anteriormente el extracto libre de nitrógeno se obtiene por diferencia por lo tanto los incrementos en los dos primeros nutrientes ocasionaron disminuciones en el contenido de extracto libre de nitrógeno que corresponde a los carbohidratos solubles (Crampton y Harris, 1969).

En materiales ensilados demasiado secos o mal compactados produce un calor excesivo y por lo tanto incrementos en la temperatura favoreciendo el desarrollo de hongos, además de aumentarse

perdidas de materia seca (Church y Pond, 1992) lo que se observa en el segundo componente.

La relación negativa en el componente principal tres en relación con el aditivo aplicado con la respuesta de la variable persistencia muestra que hubo efecto de los aditivos aplicados para disminuir la aparición de hongos filamentosos lo que concuerda con los trabajos de Ensminger *et al.* (1990) y Yan *et al.* (1998).

CONCLUSIONES

El aditivo a base de ácido propiónico y la combinación de éste con bacterias acidolácticas tienen efecto sobre el material disminuyendo la incidencia de hongo, se asume se debió a el efecto de la acidez sobre el forraje ensilado, se concluye que la aplicación de ácido propiónico en dosis de 3.04 ml/kg de forraje ensilado es efectivo en disminuir la persistencia de hongo filamentoso, por lo tanto es innecesaria la aplicación de azufre y bacterias acidolácticas, que sólo incrementarían los costos.

La única fracción nutritiva afectada fue el contenido de cenizas en los tratamientos en los que se aplicó bacterias acidolácticas, que puede deberse a que las bacterias al completar su ciclo de vida aportan los minerales que forman parte de su organismo, concluyéndose que el inoculante bacteriano modifica el contenido de cenizas y la aplicación de azufre e inhibidor a base de ácido no modifican el contenido nutritivo del ensilado.

El inhibidor a base de ácido propiónico es el aditivo que disminuye la incidencia de hongo sin afectar el contenido nutritivo del microensilado.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar el aditivo que evite la proliferación de hongos filamentosos en la superficie de microensilados de zacate rye grass y observar si hay repercusión sobre el contenido nutritivo.

Los aditivos para ensilajes se han utilizado con la finalidad mejorar o preservar la calidad del material ensilado evitando su deterioro actuando como inhibidores o bien estimulantes de la fermentación. Por tal motivo se utilizaron 160 bolsas de zacate rye grass de 23 kg de peso, cultivado y cosechado en praderas bajo riego en el Municipio de Parras de la Fuente Coahuila, los aditivos se aplicaron al momento de ser empacado y sellado, De estas 160 bolsas, 64 se distribuyeron aleatoriamente en un diseño completamente al azar con arreglo factorial AXBXC, el factor A lo conformó la aplicación de azufre con dos niveles (sin y con), el factor B la inoculación de hongo *Aspergillus* también con dos niveles (sin y con) y el tercer nivel se refiere al tipo de aditivo aplicado (sin aditivo, inhibidor, inoculante, combinación inhibidor-inoculante).

Las variables analizadas fueron: presencia de hongo, temperatura dentro de la bolsa, pH, materia seca, cenizas, extracto etéreo, fibra cruda, proteína cruda, extracto libre de nitrógeno y total de nutrientes digestibles, se realizó un análisis de varianza al día 45, se reportaron las variables que mostraron los mayores coeficientes de correlación durante los eventos de muestreo y se analizó la relación entre variables por medio de componentes principales.

El análisis de las variables al día 45 mostró diferencia altamente significativa ($P < .01$) en la respuesta de las variables persistencia y cenizas al factor aditivo, los valores mas altos en el porcentaje de ausencia de hongo lo reportaron los tratamientos donde se utilizó el inhibidor y la combinación; el contenido más alto de cenizas lo reportaron los tratamientos donde se utilizó el inoculante. Se observó respuesta significativa ($P < .05$) en persistencia a la interacción inóculo-azufre, en cenizas al factor inóculo, el extracto libre de nitrógeno a los factores azufre y aditivo y en proteína cruda al factor azufre. El resto de las variables no mostraron diferencia significativa ($P > .05$) a los factores ni a sus interacciones. Se observó relación positiva en las variables persistencia-aditivo, temperatura-materia seca, materia seca-cenizas, cenizas-aditivo, cenizas-proteína cruda, extracto etéreo-proteína cruda; y relaciones negativas entre las variables materia seca-fibra cruda, cenizas-extracto libre de nitrógeno y extracto etéreo-extracto libre de

nitrógeno. El método por componentes principales relaciona las variables cenizas, proteína cruda y extracto etéreo negativamente con el extracto libre de nitrógeno, a materia seca con temperatura y la persistencia de hongo con el aditivo.

En conclusión el aditivo a base de ácido propiónico y la combinación de éste con bacterias acidolácticas tienen efecto sobre el material disminuyendo la incidencia de hongo, lo que se asume se debió a el efecto de la acidez sobre el material ensilado, la aplicación solo de ácido propiónico en dosis de 3.04 ml/kg de forraje es efectivo en disminuir la persistencia de hongo filamentoso, por lo tanto es innecesaria la aplicación de azufre o de bacterias acidolácticas que solo incrementaría los costos. La única fracción nutritiva afectada fue el contenido de cenizas en los tratamientos en los que se aplicó bacterias acidolácticas, lo que pudo deberse a que las bacterias al completar su ciclo de vida aportan los minerales que forman parte de su organismo, el inoculante bacteriano modifica el contenido de cenizas y la aplicación de azufre e inoculante a base de ácido no modifican el contenido nutritivo del ensilado. El inhibidor a base de ácido propiónico disminuye la incidencia de hongo sin afectar el contenido nutritivo del microensilado.

LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C.J.; C.W. Mims y M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. 4^a Edición. John Wiley & Sons. New York, U.S.A.
- Anderson R.; H.I. Gracey; S.J. Kennedy; E.F. Unsworth y R.W. Steen. 1989. *Evaluation Studies in the Development of a Commercial Bacterial Inoculant as an Additive for Grass Silage*. 1. Using Pilot-scale Tower Silos. *Grass and Forage Science* 44:361-369.
- Association of Official Analytical Chemist. 1980. *Official Methods of Analysis*. 13th Edition, Washington, D.C.
- Avila G., E.; A.S. Shimada y G. Llamas. 1990. *Anabólicos y Aditivos en la Producción Pecuaria*. 1^a Edición. Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México. México D.F.
- Brock, T.D. 1978. *Biología de los Microorganismos*. 2^a Edición. Ed. Omega. Barcelona, España.
- Buckman, H.D. y C.D. Brady. 1970. *Naturaleza y Propiedades de los Suelos*. 1^a Edición. Barcelona, España.
- Campbell, R. 1985. *Plant Microbiology*. 1^a Edición. Edward Arnold. Scotland, U.K.
- Chen, J.; R. Stokes y C.R. Wallace. 1994. *Effects of Enzyme-Inoculant System on Preservation and Nutritive Value of Haycrop and Corn Silages*. *J.Dairy Sci.* 501-512.
- Church, D.C. 1991. *Livestock Feeds & Feeding*. 3^a Edition. Prentice Hall. New Jersey. U.S.A.
- Church, D.C. y W.G. Pond. 1992. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. 1^a Edición, 3^a Reimpresión. Ed. Limusa, México D.F.
- Coulombe, R.A. 1993. *Symposium: Biological Action of Mycotoxins*. *J.Dairy Sci.* 76:880-891.

- Crampton, E.W. y L.E. Harris. 1974. El Uso de los Alimentos en Formulación de Raciones para el Ganado. 2ª Edición. Ed. Acribi Zaragoza, España.
- Cremlyn, R. 1995. Plagucidas Modernos y su Aplicación Bíoquímica. Edición. 6ª Reimpresión. UTHEA. México D.F.
- Cuca G.; M., E. Avila y A. Pro. 1996. Alimentación de las Aves. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Edo. de México.
- Deacon, J.W. 1988. Introducción a la Micología Moderna. 1ª Edición. Limusa. México, D.F.
- Diego, H. 1998. Ensilajes e Inoculantes para Silos. En: Biotecnología de la industria de la alimentación animal. Vol. VI. Alltech de México Qro., Méx.
- Ensminger, M.E.; J.E.Oldfield and W.W.Heineman. 1990. Feeds and Nutrition. 2ª Edición. The Ensminger Publishing Company U.S.A.
- Freeden, A.H. y R.E. McQueen. 1993. Effect of Enzymes Additives on Quality of Alfalfa/grass Silages and Dairy Cow Performance. Can.J.Animal Sci. 73:581-591.
- García, E. 1987. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4ª Edición, México D.F.
- Giovani, W.N. 1968. Estudio Comparativo de la Eficiencia de Varios Fungicidas Específicos en el Control del Midliu Polvoriento en Vid (*Uncinula necator*). Tesis de Licenciatura. UAAAN, Buenavista Saltillo, Coahuila.
- Hiriarth, L.M. 1998. Ensilados: Procesamiento y Calidad. 1ª Edición. E Trillas. México, D.F.
- I.Selmer-Olsen, A.R. Henderson, S. Robertson y R. McGinn. 1993. Cell Wall Degrading Enzymes for Silage. 1. The Fermentation of Enzymes Treated Ryegrass in Laboratory Silos. Grass and Forage Science 48:45-54.
- Juscafresa, B. 1973. Lucha Contra los Parásitos Vegetales. 1ª Edición. Barcelona, España.
- Keady, T.W.J. y R.W.J. Steen. 1994. Effects of Treating Low Dry-matter Grass with a Bacterial Inoculant on the Intake and Performance of

- Beef cattle and Studies on its Mode of Action. *Grass and Forage Science* 49:438-446.
- Keady, T.W.J.; R.W.J. Steen; D.J. Kilpatrick y C.S. Mayne. 1994. Effect of Inoculant Treatment of Silage Fermentation, Digestibility and Intake by Growing Cattle. *Grass and Forage Science* 49:284-294
- Kung, L.; B.A. Jones; K.W. Genin; L. Sudoma; G.L. Enders y H.S. Kibona. 1987. Microbial Inoculation of Low Moisture Alfalfa Silage. *J. Dairy Sci.* 70:2069-2077.
- Leng, R.A. 1990. Factors Affecting the Utilization of "Poor-quality Forages by Ruminants Particularly Under Tropical Conditions. *Nutrition Research Reviews* 3:277-303.
- Lunden-Pettersson, K. y S.Lindgren. 1990. The Influence of the Carbohydrate Fraction and Additives on Silage Quality. *Grass and Forage Science* 45:223-233.
- Márquez, M.R. y C.I. Tejada. 1992. Alimentación de pollos con raciones contaminadas con aflatoxina B1 y adicionadas de aluminio y silicatos. En: IV Reunión de Nutrición Animal. Monterrey, N. México.
- Moreno, M.E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. 1ª Edición. UNAM. México, D.F.
- Narasimhalu, P.; L.J. Halliday; J.B. Sanderson; H.T. Kunelius y K. Winter. 1992. The Composition, Intake and Digestibility of Timothy Silage Preserved Untreated or Treated with Formic Acid or a Cellulase-Hemicellulase Preparation. *Canadian Journal of Animal Sci.* 72:431-434.
- Núñez, H.G. y F.E. Contreras. 1999. Proceso de Ensilaje de Maíz. Efecto de los Componentes Tecnológicos para la Producción de Ensilados de Maíz y Sorgo. SAGAR. INIFAP. Torreón Coah.
- Preston, T.R. y A.R. Leng. 1989. Ajustando los Sistemas de Producción Pecuaria a los Recursos Disponibles: Aspectos Básicos y Aplicados del nuevo Enfoque sobre la Nutrición de Rumiantes en el Trópico. CONDRI, Cali, Colombia.
- Raymond, F.; R. Redman y R. Waltham. 1986. Forage Conservation and Feeding. 4th Edition. Ed. Hazell Watson & Viney Limited, U.K.

- Roberts, C.R. 1995. Microbiology of Stored Forages. Edited by Ken R. J.M. and M.A. Peterson. Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, U.S.A.
- Santacruz, J.M.; R.Gomez; G. Llamas; M. Ramirez; H. Romero y Cañez. 1982. Respuesta de los Ensilajes de Sorgo a Adiciones de Melaza, Amonia o Urea. Fcytpran.htm en <http://www.uach.cl>.
- Sheperd, A.C.; M. Maslank; D. Quinn y L. Kung, Jr. 1995. Additives Containing Bacteria and Enzymes for Alfalfa Silage. J. Dairy Sci. 78:565-572.
- Smith, E.J.; A.R. Henderson; J.D. Oldham; D.A. Whitaker; K. Aitchison; D.H. Anderson y J.M. Kelly. 1993. The Influence of Inoculant/Enzyme Preparation as an Additive for Grass Silage Offered in Combination with three Levels of Concentration Supplementation on Performance of Lactating Dairy Cows. J.D. Sci. 56:301-310.
- Sudano, Ch.S. 1979. Animals Feeds and Pet Foods. Recent Developments. 1ª Edition. Noyes Data Corporation. Park Ridge, New Jersey, U.S.A.
- Watson, S.J. y A.M. Smith. 1984. El Ensilaje. 9ª Impresión. Editorial Continental. México, D.F.
- Weinberg, Z.G.; G. Ashbell; A. Azrieli y Brukental. 1993. Ensiling Pea, Ryegrass and Wheat with Additives of Lactic acid Bacteria (Lactobacillus) and Cell wall Degrading Enzymes. Grass and Forage Science 48:70-78.
- Wernli, C. y F. Ojeda. 1990. Metodología para Investigaciones sobre la Conservación y Utilización de Forrajes. En: Nutrición de los rumiantes, Guía metodológica de investigación. 1ª Edición. II Congreso ALPA, RISPAL. San José, Costa Rica.
- Yan, T.; D.C. Patterson; F.J. Gordon y J. Kilpatrick. 1998. Effects of Bacterial Inoculation of Unwilted and Wilted Grass Silages on Rumen Microbial Activity, Silage Nutrient Degradability and Digestibility. Journal of Agriculture Science 131:103-112.

APENDICE

Cuadro A.1 Concentración de Valores del Cuadrado Medio del Error de los Análisis de Varianza.

FV	gl	VARIABLES										
		P ⁴	PH ⁵	T ⁶	MS ⁷	C ⁸	EE ⁹	FC ¹⁰	PC ¹¹	ELN ¹²	TND ¹³	
S ¹	1	0.390625	0.035156	0.075625	0.589056	0.642001	0.94575*	0.00035	8.85806*	24.9001*	0.30250	
I ²	1	0.015625	0.045156	3.515625*	3.920400	2.759751*	0.094556	6.34410	4.812539	3.267056	0.01155	
A ³	3	2.307291**	0.036106	0.523333	1.196079	4.297764**	0.392627	0.35003	4.537526	17.90362*	2.13208	
S*I	1	0.765625*	0.018906	0.010000	6.187656	2.194101	0.031506	1.69325	0.022876	10.09650	1.67055	
S*A	3	0.098958	0.023906	0.752291	1.257702	0.783230	0.205810	2.32294	1.922976	2.126737	0.31460	
I*A	3	0.057291	0.010572	0.017291	1.510729	0.804589	0.199702	3.36537	2.313093	6.955660	1.00356	
S*I*A	3	0.057291	0.065989	0.209166	2.762418	1.121314	0.095435	4.23548	0.545939	5.374485	0.30616	

* Diferencia significativa (P<.05)

** Diferencia altamente significativa (P<.01)

1 Azufre

2 Inoculación con *Aspergillus*

3 Aditivos

4 Persistencia

5 Potencial Hidrógeno

6 Temperatura

7 Materia seca

8 Cenizas

9 Extracto etéreo

10 Fibra Cruda

11 Proteína Cruda

12 Extracto Libre de Nitrógeno

13 Total de Nutrientes Digestibles