



**“EFECTO DE UN INOCULANTE
EN LA CALIDAD FERMENTATIVA EN EL ENSILADO DE MAÍZ
(*Zea mays* var. Elena UNLPam).”**

Trabajo final de graduación presentado para obtener el título de: Ingeniera Agrónoma.

Autores:

Escalante, Jessica Rocío.

Focke, María Belén.

Director: Gallace, María Eugenia – Microbiología Agrícola.

Codirector: Zingaretti, Osvaldo - Cereales y Oleaginosas.

Asesor: Dalmaso, Lucas Pablo - CONICET- FA UNLPam.

Evaluadores:

Fernández, Miguel Ángel - Cereales y Oleaginosas.

Thuar, Alicia - Microbiología Agrícola.

FACULTAD DE AGRONOMÍA, UNLPam.

Santa Rosa (La Pampa) - Argentina. 2018.

INDICE

RESUMEN	3
Palabras claves	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	8
Objetivos específicos	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Ensayo y determinaciones para cumplir con el objetivo A	9
Determinaciones para cumplir con el objetivo B	12
Determinaciones para cumplir con el objetivo C	15
Análisis estadístico	16
RESULTADOS Y DISCUSION	17
Evolución de temperatura y pH	17
Materia seca al inicio y al día 64 de ensilado	19
Características organolépticas	20
Composición microbiana del ensilado	23
1) Bacterias aerobias totales	23
2) Mohos y levaduras	24
3) Bacterias lácticas	25
Evaluación de la estabilidad aeróbica	26
Calidad Nutricional	27
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29

RESUMEN

El ensilaje de maíz es una de las reservas forrajeras más importantes en el mundo, en donde la práctica de adición de inóculos se utiliza para mejorar la calidad de los ensilados. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del uso de un inoculante biológico sobre la calidad fermentativa, estabilidad aeróbica y composición microbiana del ensilado de maíz (*Zea mays* var. Elena UNLPam). Se elaboraron 36 microsilos de 850 cm³, la mitad con inóculo microbiano y la otra mitad sin aplicación. Se midió a lo largo del ensayo: pH, contenido de MS, temperatura, número de microorganismos y estabilidad aeróbica. Los datos fueron analizados mediante ANAVA y las medias con LSD de Fisher. La variación de la temperatura a lo largo del ensayo no mostró diferencias entre los tratamientos, si se encontró diferencias significativas en el pH. El porcentaje de materia seca, al momento de picar las plantas de maíz, se halló dentro del rango recomendado. El material presentó características favorables en cuanto a color, olor, textura y humedad. En el tratamiento no inoculado, se encontró mayor número de bacterias mesófilas aeróbicas y hongos, respecto al inoculado. El número de bacterias lácticas se incrementó con la aplicación de microorganismos. Se puede concluir que el agregado de inoculante mejoró la calidad fermentativa y estabilidad aeróbica del ensilado de maíz.

Palabras claves

Reservas forrajeras, silos, estabilidad aeróbica y composición microbiana.

ABSTRACT

Corn silage is one of the most important forage reserves in the world, where the practice of adding inocula is used to improve the quality of silage. The objective of this work was to evaluate the effect of the use of a biological inoculant on the fermentative quality, aerobic stability and microbial composition of corn silage (*Zea mays* var. Elena UNLPam). 36 microsilos of 850 cm³ were elaborated, half with microbial inoculum and half with no application. The pH, DM content, temperature, number of microorganisms and aerobic stability were measured throughout the test. The data were analyzed by means of ANOVA and the means with Fisher's LSD. The variation of the temperature throughout the trial showed no differences between the treatments, if significant differences were found in the pH. The percentage of dry matter, when chopping the corn plants, was within the recommended range. The material presented favorable characteristics in terms of color, smell, texture and humidity. In the non-inoculated treatment, a higher number of aerobic and fungal mesophilic bacteria was found, compared to the inoculated one. The number of lactic bacteria increased with the application of microorganisms. It can be concluded that the inoculant addition improved the fermentative quality and aerobic stability of the corn silage.

Key words: Forage reserves, silos, aerobic stability and microbial composition.

INTRODUCCIÓN

La Región Semiárida Pampeana se caracteriza por poseer sistemas de producción predominantemente mixtos. Los inviernos son secos con heladas frecuentes e intensas, la oferta forrajera en este periodo es variable y en ocasiones deficiente. Una estrategia para sobrellevar estas deficiencias es la obtención de reservas forrajeras. Una de ellas es la confección de ensilados a partir de gramíneas anuales y pasturas. El ensilaje es un método de conservación del forraje húmedo; basado en convertir carbohidratos solubles en ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, bajo la acción de bacterias en condiciones anaeróbicas (Filya, 2003). Estos ácidos orgánicos reducen el pH del medio impidiendo la proliferación de microorganismos indeseables (degradadores de la materia seca), tratando de mantener el valor nutricional del forraje al momento de ensilar (Cañete y Sancha, 1998; Garcés *et al.* 2006).

En algunas situaciones se produce un deterioro en la calidad del ensilaje, para evitar esto se han empleado aditivos químicos y biológicos como los inoculantes bacterianos. Los inoculantes son productos biológicos a base de bacterias que tienen la capacidad de producir ácido láctico y disminuir el pH a rangos de 3 a 4 (Holzapfel y Schillenger; 1992; Hammes *et al.*, 1992).

La estabilidad aeróbica del ensilaje es la resistencia del forraje al deterioro después de la apertura del silo, o dicho de otro modo, el tiempo que el ensilaje permanece estable sin alterar sus características físicas como químicas en contacto con el aire (Jobim *et al.*, 2007). Con la utilización del silo, una vez abierto y expuesto al oxígeno, se reactivan aquellos procesos que bajan la calidad del forraje conservado. A este proceso se lo denomina “deterioro aeróbico” donde se manifiesta incremento de la temperatura y del pH del forraje que acompaña a la multiplicación de levaduras primero y de mohos después, una vez que se

reestablecen las condiciones de aerobiosis en la masa forrajera ensilada. (McDonald *et al.*, 1991). El uso de bacterias lácticas heterofermentativas, como *Lactobacillus buchneri*, puede mejorar la estabilidad aeróbica en ensilados (Oude Elferink *et al.*, 2001 y Driehuis *et al.*, 1999).

El ensilaje de maíz es una de las reservas más importantes en el mundo, ya que posee altos rendimientos de materia seca por hectárea, buen valor energético, alta palatabilidad, rápida cosecha y no requiere preoreo. (Romero, 2014).

Según la Cámara Argentina de Contratistas Forrajeros (2018), en Argentina, la superficie total de silaje para la campaña 2016-2017 fue de 1.744.594 hectáreas. Los cultivos destinados a tal fin fueron maíz (61,9%), sorgo (17,8 %) y verdes y pasturas (20,02%). En ensilados de maíz y sorgo, sólo el 34.2% fueron inoculados, mientras que en ensilados de pasturas y verdes, esta práctica se incrementa hasta el 89.8%.

Existen dos tipos principales de silos usados en la Argentina y a nivel mundial; que se diferencian principalmente en la estructura de almacenaje, en el costo de confección y en la forma de suministrar el forraje. Uno es el silo aéreo en cual el producto se encuentra sobre el suelo o sobre una plataforma de cemento y éste es tapado para lograr la fermentación adecuada. El costo de confección en este tipo de silos es inferior al costo del silo bolsa, y en cuanto al racionamiento, la diferencia radica en el ancho de boca que tenga el silo, lo que dependerá de la cantidad de animales a alimentar, es decir los kilos por día a suministrar. El otro tipo de silaje es el silo bolsa, donde el cultivo picado es introducido a presión dentro de un contenedor plástico con forma de cilindro. De esta forma se evita o disminuye la concentración de oxígeno y favorece la fermentación anaeróbica. Este tiene mayor porcentaje de realización en la argentina (76.1%), respecto al silo aéreo (23,9%) (Cámara Argentina de Contratistas Forrajeros, 2018).

La Facultad de Agronomía de la UNLPam posee diversos antecedentes en cuanto al estudio de gramíneas anuales. Uno de ellos es referido a la cruce original entre *Zea mays* x *Zea diploperennis* donde se derivaron líneas endocriadas de maíces con características forrajeras. Estas líneas se diferencian en cuanto a: ciclo de madurez, altura de la planta, número de tallos por planta, diámetro del tallo, número de mazorcas por tallo y relación hoja/tallo (Paccapelo *et al.*, 1999). Los híbridos entre *Zea mays* y *Zea diploperennis* L. son, por lo general muy heteróticos, expresando su vigor especialmente a través de elevada prolificidad, número de nudos productivos por tallo, número de espigas en el nudo productivo superior, número de espigas por tallo y número de espigas por plantas (Corcuera y Magoja, 1988). Como resultado de estos estudios se dio el origen de la variedad forrajera de maíz *Zea mays* L. Elena-UNLPam. Es una variedad de ciclo largo, de vigoroso crecimiento inicial, con numerosos macollos fértiles y con buen comportamiento sanitario durante el ciclo de cultivo (Paccapelo, 2015).

Determinar el efecto de un inoculante en la calidad fermentativa del ensilado de maíz (*Zea mays* Elena- UNLPam), brinda información científica sobre el comportamiento del proceso del ensilaje y ser considerado como una nueva opción tecnológica para los productores agropecuarios.

HIPÓTESIS

La inoculación con bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus salivarius*) y *Enterococcus faecium* mejora la calidad fermentativa y la estabilidad aeróbica en ensilado de *Zea mays* var. Elena UNLPam.

OBJETIVOS

Objetivo general: estudiar el efecto del uso de un inoculante sobre la calidad fermentativa, estabilidad aeróbica y composición microbiana del ensilado de maíz.

Objetivos específicos:

- A.** Evaluar la evolución de la calidad fermentativa durante los primeros 60 días de ensilados de *Zea mays* var. Elena UNLPam, inoculados y sin inocular.
- B.** Determinar la composición microbiana del ensilado.
- C.** Estudiar la estabilidad aeróbica del ensilado de *Zea mays* var. Elena UNLPam.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo y determinaciones para cumplir con el objetivo A

Se cosechó plantas enteras de *Zea mays* var. Elena UNLPam provenientes de un lote ubicado en el campo de enseñanza perteneciente a la Facultad de Agronomía, UNLPam con tres o más macollos desarrollados (**Figura 1, A**). Se picó el material con una trituradora marca Trapp TR 200 (**Figura 1, B**) y se homogenizó. La mitad del material triturado fue tratado con el inoculante comercial SIL-ALL^{4x4} (**Figura 1, C**) según indicaciones del marbete (250g de inoculante cada 50 toneladas de forraje diluido en 2 litros de agua). Dicho inoculante está compuesto por bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus salivarius*) y *Enterococcus faecium*. La otra parte no fue tratada con inoculante.



Figura 1: (A) Macollos de maíz, (B) Máquina trituradora y (C) Inoculante utilizado.

Se confeccionaron 36 microsilos utilizando frascos de vidrio de un volumen de 850 cm³ (Figura 2, A), 18 microsilos con el tratamiento inoculado (I) y 18 microsilos no inoculados (NI). Una vez confeccionados y sellados los microsilos, fueron ubicados en el laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía a temperatura ambiente planificando la apertura de 3 repeticiones por tratamiento al día 2, 4, 8, 16, 32 y 64. En cada apertura se midió pH y temperatura del ensilado (**Figura 2, C**). Además se evaluó las características organolépticas como color, olor, estado de madurez y textura (**Tabla 1**), las cuales se determinaron siguiendo la caracterización según *Gallardo* (2003) (**Figura 2, B**).

Para determinar si existía pérdidas de material, se determinó porcentaje de materia seca de la biomasa triturada al inicio del ensayo (día 1) y del ensilado al final del mismo (día 64).

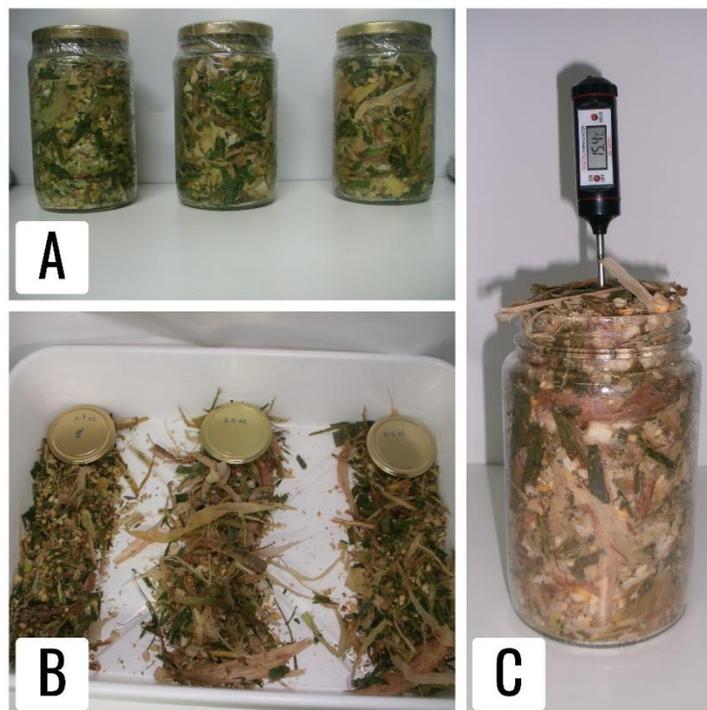


Figura 2: (A) *Microsilos*, (B) *Material a evaluar*, (C) *Medición de temperatura*.

Tabla 1. *Escala para la valoración organoléptica de los ensilajes de Gallardo (2003) modificada.*

Característica	Valoración	Estado del material
Color	<ul style="list-style-type: none"> • Verde oliva-levemente amarillento. • Verde azuláceo-secciones oscuras. • Marrón tabaco-secciones quemadas. • Secciones blancas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones adecuadas. • Material ensilado inmaduro muy húmedo. • Material sobre-maduro-ingreso de aire. Lento llenado de silo. • Presencia de hongos-ingreso de aire.
Olor	<ul style="list-style-type: none"> • Agradable, aromático dulzón. • Fuertemente avinagrado. • Rancio- putrefacto. • A tabaco. 	<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones adecuadas. • Fermentación acética-material húmedo. • Fermentación butírica-material contaminado con tierra. • Material sobre-maduro-reacción Maillard.
Humedad	<ul style="list-style-type: none"> • No humedece las manos al ser comprimido dentro del puño, con una presión normal se mantiene suelto el ensilaje. • No humedece las manos al ser comprimido dentro del puño, con presión normal se mantiene suelto el ensilaje. • Al ser comprimido en el puño gotean efluentes, con tendencia a ser compactado y formar una masa. • Destila líquido efluente, se compacta con facilidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Ensilaje de excelente calidad. • Ensilaje de buena calidad. • Ensilaje de regular calidad. • Ensilaje de mala calidad.

	y llega a tomar la forma deseada.	
Estado de madurez	<ul style="list-style-type: none"> • Hojas verdes- alta humedad al tacto- granos lechosos- efluentes. • Hojas verdes- tallos flexibles- granos pastosos y procesados. • Hojas amarillas- tallos duros- granos maduros y enteros- material seco. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivo inmaduro- sin oreo previo. • Estado óptimo de madurez. • Cultivo sobre- maduro- estrés por falta de agua.
Textura	<ul style="list-style-type: none"> • Firme. • Blanda y viscosa. • Floja y mullida. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adecuado procesamiento. • Exceso de humedad. • Maduro- picado grueso- poca compactación.

Determinaciones para cumplir con el objetivo B

A los 64 días, se realizó la determinación de la composición microbiana del ensilado mediante la técnica de suspensiones y diluciones y posterior recuento en placa (**figura 3**). Para ello se pesaron 2,5 g de ensilado y se colocaron en un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 100 mL de agua estéril. Se agitó a 150 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente según lo descrito por Sparo y Mallo (2001). Se extrajo 1 mL y se efectuaron diluciones seriadas al décimo y por triplicado en agua estéril. El recuento microbiano se realizó en placas de Petri con siembra en profundidad, que presentaron entre 30 y 300 colonias, utilizando un contador de colonias.

La siembra para recuento de bacterias aerobias totales se realizó por triplicado utilizando el medio Plate count agar (PCA) (Tabla 2) y se incubó en estufa a 28°C durante 72 horas en aerobiosis.

Tabla 2: *Composición nutricional del medio PCA.*

Plate count agar (PCA) en gramos por litro de agua	
Extracto de levadura	2.5
Tripteína	5.0
Glucosa	1.0
Agar	15.0
pH	7

La siembra para recuento de hongos totales se realizó por triplicado utilizando el medio Agar papa glucosado con ácido tartárico (APG) para inhibir el crecimiento bacteriano (Tabla 3) y se incubó en estufa a 28°C durante 72 horas en aerobiosis.

Tabla 3: *Composición nutricional del medio APG.*

Agar papa glucosado con ácido tartárico en gramos por litro de agua	
Infusión de papa	200
Glucosa	20
Agar	15
Acido tartárico	10 mL
pH	3.5

La siembra para recuento de bacterias ácido lácticas se realizó por triplicado utilizando el medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) agar (Tabla 4) y se incubó a 30°C durante 72 horas.

Tabla 4: *Composición nutricional del medio MRS.*

Man, Rogosa y Sharpe (M.R.S) en gramos por litro de agua	
Proteosa peptona N°3	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitán	1 mL
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	13.0
pH	6.4

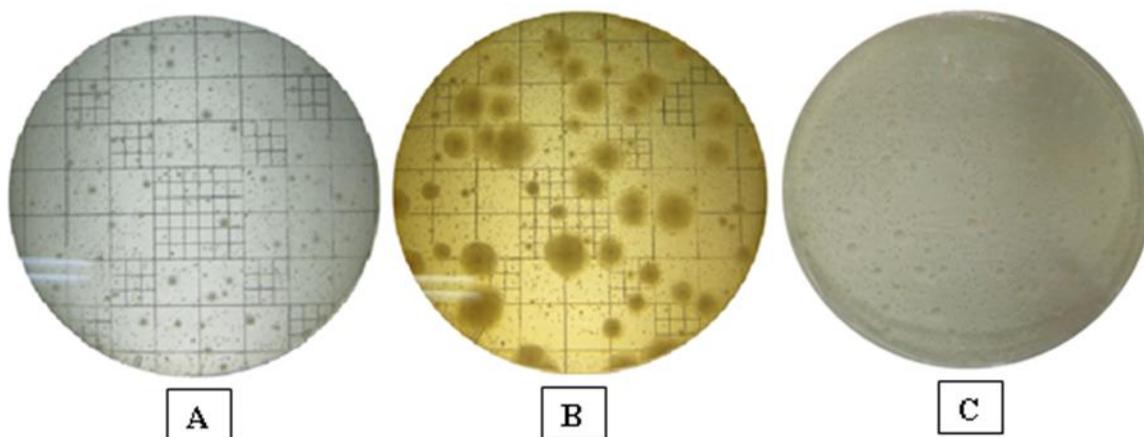


Figura 3: Recuento sobre placas de Petri de bacterias aerobias totales (A), hongo y levaduras (B) y bacterias lácticas (C).

Determinaciones para cumplir con el objetivo C

A los 64 días, los microsilos se abrieron para evaluar la estabilidad aeróbica siguiendo la metodología propuesta por Ashbell *et al.* (1990). Dicho método consiste en exponer una capa del ensilado al aire y determinar el dióxido de carbono producido luego de 2, 7, 10, 15 y 21 días de exposición. Para ello se tomaron 150 g de ensilaje que fueron colocados en un dispositivo compuesto por una botella de polietileno (PET) con capacidad de 1,5 L (**Figura 4**). En la parte inferior de la unidad se colocaron 100 mL de hidróxido de potasio (KOH) al 20%, que actuó como trampa para la captura de dióxido de carbono producido por los microorganismos. El CO₂ producido en los distintos tiempos, se determinó titulando 10 mL de la solución de KOH con una solución de ácido clorhídrico 1N. La cantidad de gas carbónico (g/kg de MS) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CO}_2 = (0,044 T * V) / (A * S * \text{MS}) \text{ donde:}$$

T= volumen de HCl 1N gasto en la titulación (mL)

V= volumen total de KOH 20% (100 mL)

A= volumen de KOH 20% usado en la determinación (10 mL)

S= cantidad de ensilado (kg) colocado en los sistemas

MS= materia seca del ensilado.

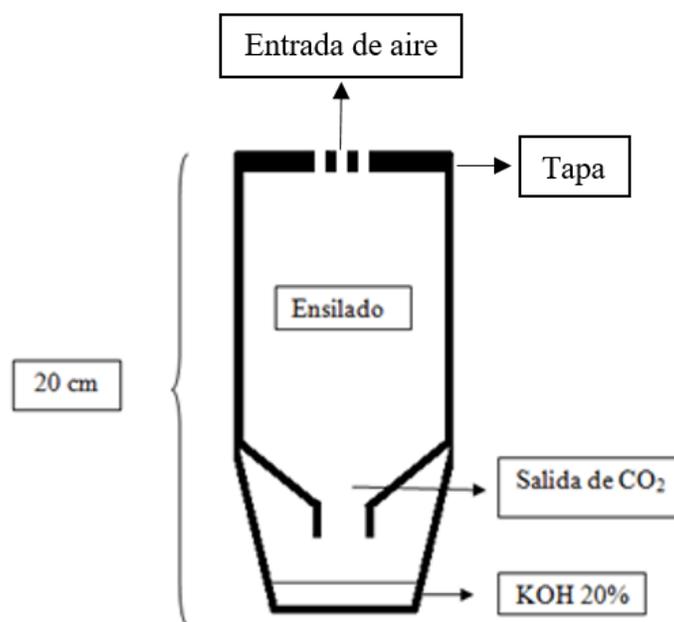


Figura 4: Sistema para determinación de la producción de CO₂.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante ANAVA. Las comparaciones entre medias de tratamientos se realizaron a través de la prueba LSD de Fisher. Para estos análisis se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSION

Evolución de temperatura y pH

La variación de la temperatura a lo largo del ensayo no mostró diferencias significativas entre los dos tratamientos (**Figura 5**), sin embargo se pudo observar que la temperatura en el interior de los silajes fue menor a la temperatura ambiente, lo que fue contrario a la situación esperable ya que la actividad biológica es exotérmica. Esto podría explicarse por la gran relación superficie volumen que posee el diseño de los microsilos. Mier Quiroz (2009) explica que las diferencias causadas por el tiempo de almacenamiento no responden a ninguna tendencia y principalmente se deben al efecto de la temperatura ambiental, que incrementa o disminuye la temperatura del ensilado. Argamentería *et al.* (1997) afirman que aunque no se conocen las causas exactas, que determinan la velocidad del deterioro e incremento de temperaturas en materiales ensilados al tratarse de un proceso biológico, estos procesos están relacionados con la variación de la temperatura ambiente y el calor generado durante la apertura, de ahí su mayor importancia en verano que en invierno. Para Jobim *et al.* (1997), es sabido que la temperatura afecta de forma significativa el crecimiento y actividad de los microorganismos que actúan en los ensilajes. Así mismo la elevación de la temperatura diurna frente a la nocturna puede resultar en cambios significativos en la actividad de los microorganismos.

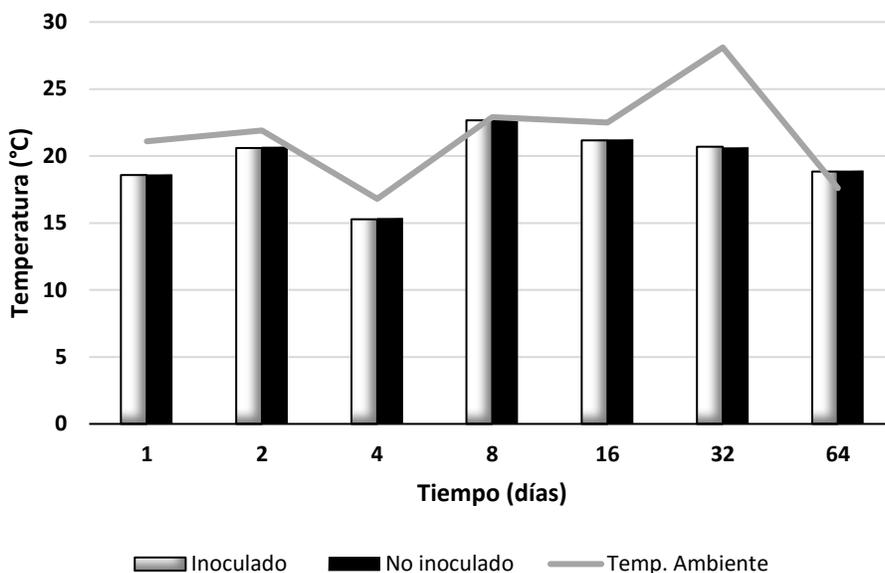


Figura 5: *Temperatura de la biomasa a lo largo del tiempo ensayado de silajes inoculados y sin inocular.*

En cuanto a los valores de pH, se encontró diferencias significativas entre tratamientos a partir del día 4 de iniciado el ensayo (**figura 5**), evidenciando que en el tratamiento inoculado el valor de pH descendió más rápidamente que el tratamiento sin inocular, lo que indicaría una mayor habilidad fermentativa. Los valores de pH finales se estabilizaron por debajo de 4,1; lo que demuestra que hubo buenas condiciones de anaerobiosis, humedad y concentración de carbohidratos, logrando así un descenso adecuado de pH para una correcta conservación del ensilado en ambos tratamientos. Cañete y Sancha (1998), recomiendan un valor por debajo de 4,2 para una aceptable fomentación. Para Cherney y Cherney (2003), el valor de pH de 4,2 puede ser un indicador de buena calidad de fermentación en ensilajes de bajo contenido en MS.

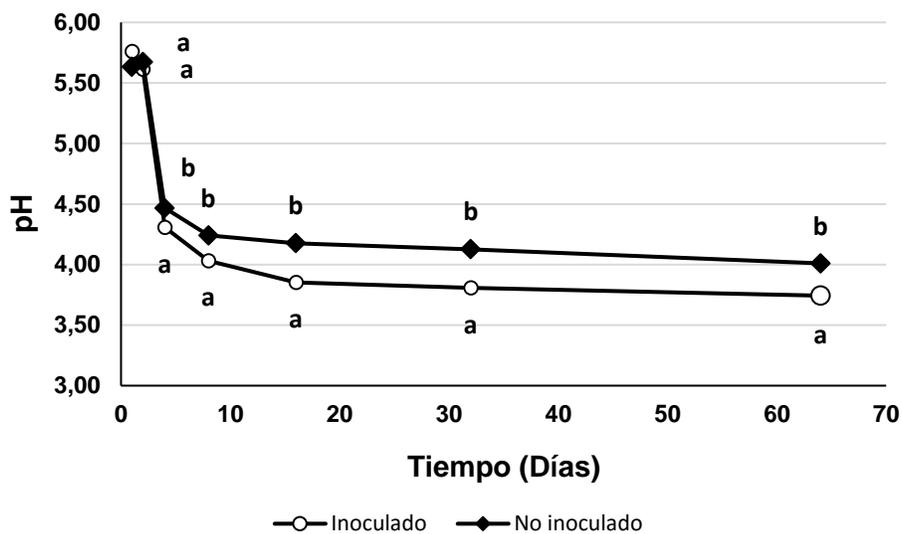


Figura 6: Valor de pH en función del tiempo de silajes inoculados y sin inocular. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Materia seca al inicio y al día 64 de ensilado.

Según Ashbell y Weinberg (2001), el contenido correcto de materia seca de la planta debe ser de 30-35% antes del ensilado. Este valor es un factor importante para el éxito de la fermentación, así la producción de amoníaco por bacterias butíricas se ve considerablemente atenuado (Cañete y Sancha, 1998). A su vez Pigurina y Pérez Gomar (1994), indican que el momento óptimo para ensilar se encuentra entre 32-40% de MS. Se puede observar que en nuestro ensayo el porcentaje de MS al picar las plantas de maíz, se encontró dentro del rango recomendado por estos autores (32,28%). Además en comparación con el inicio, no hay pérdidas de materia seca luego de 64 días de evaluación para ninguno de los dos tratamientos estudiados. Esto se debe al adecuado tamaño de corte, compactado y buen sellado de los microsilos, que hicieron que bajo estas condiciones no se presente ningún efecto por

consecuencia de la oxidación, ya que el producto aparentemente no entro en contacto con el aire. (Figura 7).

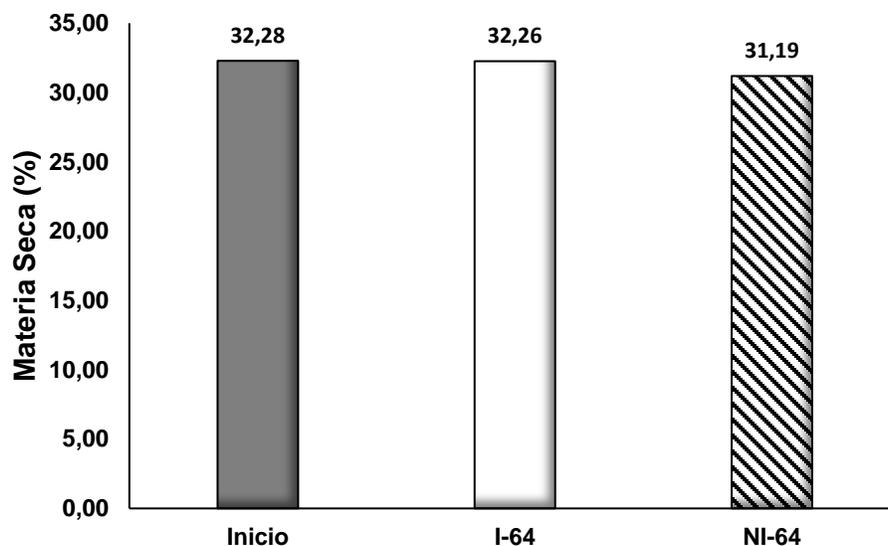


Figura 7: *Materia Seca expresado en % al inicio y fin del ensayo de material ensilado con y sin inoculante.*

Características organolépticas.

Se evaluó las características organolépticas con cada apertura de los microsilos (2, 4, 8, 16, 32,64 días) (**tabla 5**). El estado de madurez del material vegetal que se utilizó para la confección de los microsilos fue el óptimo, presentando hojas verdes, tallos flexibles y granos pastosos ($\frac{3}{4}$ línea de leche). En cuanto al color, luego de 64 días de ensilado, observamos un cambio de coloración al comparar los dos tratamientos respecto a la muestra inicial. En el caso del tratamiento inoculado presentó un color amarillo en comparación al tratamiento no inoculado que fue amarronado. Respecto al olor, en la mayoría de la muestras fue agradable,

con excepción de tres muestras donde se detectó un leve olor avinagrado/cetona o atabacado. La textura se mantuvo firme en todo el proceso y bajo ambos tratamientos.

El factor humedad mostro un comportamiento adecuado ya que al ser comprimido no se observó desprendimiento de líquido, tampoco tuvo tendencia a la compactación ni a formar una masa.

Por ultimo podemos destacar que los microsilos presentaron características favorables en cuanto a color, olor, textura y humedad. Observamos en algunas muestras la presencia de moho en la parte superficial que puede haberse ocasionado por posibles infiltraciones de aire, que no afectaron en si la calidad del ensilado. En consecuencia, durante el proceso de fabricación y almacenamiento existió una adecuada fermentación, y el sellado tuvo éxito. En todos los casos los ensilados fueron clasificados como de buena calidad según lo señalado por Gallardo (2003). Para Tobía *et al.* (2003), la valoración de ensilajes mediante las características sensoriales en el campo es una manera rápida, económica y sencilla, pero no deja de ser una herramienta subjetiva.

Tabla 5: Características organolépticas de ensilado de maíz para dos tratamientos, inoculado (I) y no inoculado (NI) en distintas fechas de apertura.

Días de apertura	2		4		8		16		32		64	
	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
Color	Verde oliva.	Verde oliva.	Verde levemente amarillento.	Verde oliva levemente amarillento.	Verde levemente amarillento.	Verde oliva levemente amarillento.	Marrón claro.	Amarillento.	Marrón claro.	Amarillento.	Marrón claro.	Marrón claro, levemente amarillento.
Olor	Agradable.	Agradable.	Agradable.	Agradable.	Agradable, levemente avinagrado. En una de las muestras olor a acetona.	Agradable.	Agradable.	Agradable.	Agradable, levemente atabacado.	Agradable, levemente avinagrado.	Agradable.	Agradable.
Textura	Firme.	Firme.	Firme.	Firme.	Firme.	Firme.	Firme.	Firme.	Firme.	Firme.	Firme.	Firme.
Humedad	No humedece las manos al ser comprimido con presión normal.	No humedece las manos al ser comprimido con presión normal.	No humedece las manos al ser comprimido con presión normal.	No humedece las manos al ser comprimido con presión normal.	Leve humedad al tacto.	Moderada humedad al tacto.	Leve humedad al tacto.	Moderada humedad al tacto.	Leve humedad al tacto.	Moderada humedad al tacto.	Leve humedad al tacto.	Moderada humedad al tacto.
Otros					Presencia de hongos en la superficie.		Presencia de hongos en la superficie.					

Composición microbiana del ensilado.

1) Bacterias aerobias totales.

En la **figura 8** puede observarse una diferencia altamente significativa ($p < 0.05$) en el número de bacterias mesófilas aeróbicas totales, siendo mayor en el tratamiento no inoculado respecto al inoculado. Esto podría explicarse porque el tiempo de estabilización del silaje fue mayor al no incorporar inoculante, obteniendo así, una carga de microorganismos aeróbicos más alta. Cai *et al.* (1998) encontraron para maíz $1E^6$ UFC/g, mientras que nuestro grupo conto una media $4E^4$ UFC cuando no se inoculó y $1.5 E^4$ cuando se aplicó el inoculante microbiano.

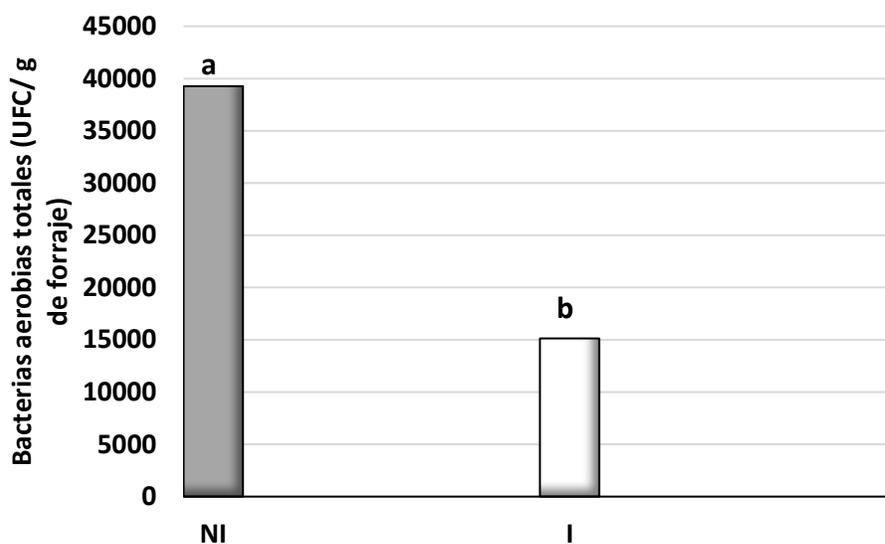


Figura 8: Recuento de bacterias totales aerobias (UFC/g) en función de los tratamientos, inoculado y no inoculado. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

2) Mohos y levaduras.

Se determinó el número de mohos y levaduras en el forraje, luego de la apertura de los microsilos. Estos microorganismos son considerados desfavorables para la conservación debido a que fermentan los azúcares, limitando la actividad de las bacterias lácticas y utilizan el lactato ya formado. En la **figura 9** se puede observar una diferencia altamente significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos inoculado y no inoculado, tanto en el recuento de hongos totales como en la diferenciación de mohos y levaduras. Se contabilizó una media de hongos totales de 3×10^3 UFC por gramo de forraje ensilado y una disminución con la aplicación de inoculante a 2×10^2 UFC. Esto podría deberse a una baja en la carga de microorganismos aeróbicos en la etapa inicial al estabilizarse el pH de forma más rápida mediante el uso de inoculante. Nuestros valores fueron inferiores a los reportados por Kung et al. (2000), que en el día 60 de ensilaje realizaron recuentos de $9,4 \times 10^5$ UFC/g y Ranjit y Kung (2000) reportando valores a los 100 días de 5×10^6 UFC/g para ensilajes de maíz. Fernandez-Lorenzo *et al.* (2008), también encontraron que el uso de inoculantes a base de *Lactobacillus buchneri* en ensilados de maíz pudo reducir los recuentos de mohos y levaduras. Lisette y Ramírez (1989) describieron un desarrollo de mohos y levaduras en valores de 1×10^2 UFC/g de forraje de king grass, sugiriendo que la flora ácido láctica fue dominante en relación con los mohos y las levaduras, resultando una fermentación preferentemente láctica, por lo tanto inhibición de hongos.

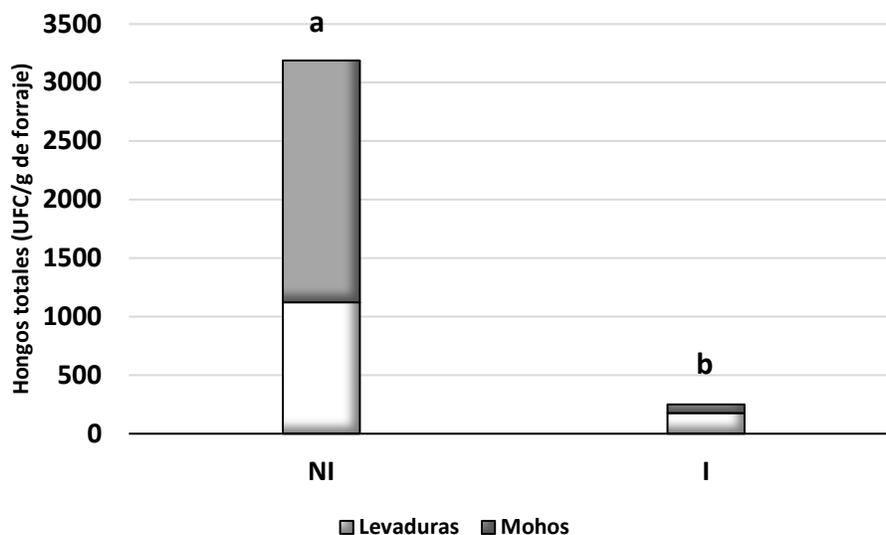


Figura 9: Recuento de hongos totales (mohos y levaduras) en función de los tratamientos.

Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

3) Bacterias lácticas.

Como se puede observar en la **figura 10**, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el número de bacterias productoras de ácido láctico en el tratamiento inoculado comparado al no inoculado. Esto se debe al agregado exógeno de las mismas con la incorporación de inoculante al silaje durante la confección, en una concentración 1000 veces superior a la concentración existente en el cultivo; de manera tal de dominar el proceso fermentativo y asegurar una rápida estabilización del material ensilado. De todas formas, hay que destacar la presencia de bacterias lácticas epífitas presente en el cultivo de maíz, logrando un buen proceso fermentativo del ensilaje bajar el pH en el tratamiento no inoculado. Bautista *et al.* (2007) observaron una mayor concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el silo tratado con inoculante bacteriano comparado con silos sin inoculante utilizando maíz, al igual que Bautista *et al.* (2005).

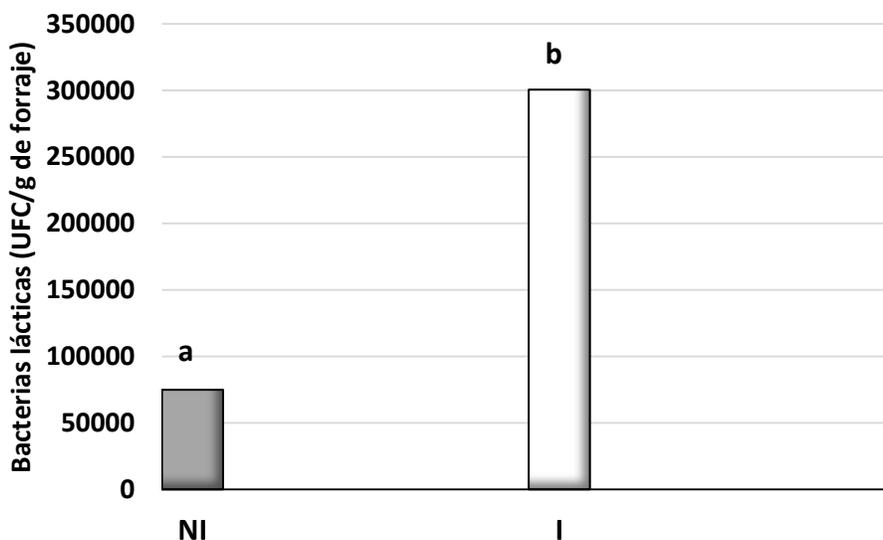


Figura 10: Recuento de bacterias productoras de ácido láctico por gramo de forraje de maíz ensilado, con y sin aplicación de inoculante microbiano. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Evaluación de la estabilidad aeróbica

En silajes de 64 días se evaluó estabilidad aeróbica; fue analizada a los 2, 7, 10,15 y 21 días posteriores a la apertura de los microsilos, mediante la medición de los gramos de CO_2 desprendidos. Puede observarse que luego de exponer el forraje ensilado al aire 21 días, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la cantidad de CO_2 desprendido, siendo mayor en el ensilado no inoculado, con un desprendimiento de 28,57 gramos de CO_2 por kilo de materia seca contra un total de 25.30 gramos en el caso del ensilado en el que se aplicó inoculante. (**Figura 11**). Resultados similares encontró Mier Quiroz (2009), donde trabajando con ensilado de maíz sin inóculo se incrementó la producción de gas carbónico, mostrando un aumento en la producción con el tiempo de almacenamiento (90 vs 120 días de ensilado) y con el tiempo de exposición al aire asociándolo a la mayor cantidad residual de hidratos de carbono que debe quedar en este tipo de silo, determinando que fue menos

estable que el ensilaje de maíz con inóculo. Por otra parte, Guim *et al.* (2002), al trabajar con pastos tropicales tratados con inóculo bacteriano comercial, no observó diferencias significativas ($P>0,05$) entre tratamientos, pudiendo destacar que al final de ocho días de aireación se pudo detectar una tendencia de producción más baja de CO_2 para ensilados inoculados.

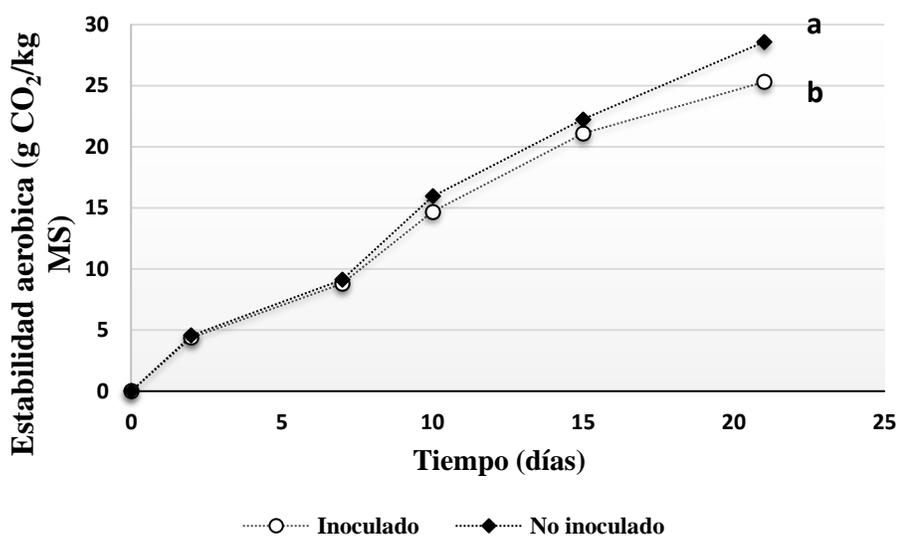


Figura 11: Estabilidad aeróbica del ensilado medida luego de 2, 7, 10, 15 y 21 días de exposición al aire. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$).

Calidad Nutricional

Como información adicional se determinaron valores nutricionales utilizando un analizador portátil AgriNIR. Estos parámetros fueron medidos en muestras de ensilado sin inocular e inoculado luego de 64 días de la confección de los microsilos. Consistieron en FDA, FDN, proteína, cenizas, almidón y grasa (**tabla 6**). Como primer estudio podríamos determinar que la variedad de maíz Elena UNLPam, demuestra que a nivel de laboratorio los silajes presentan valores promedio de calidad nutricional similares a distintas variedades de

maíz ensilado como reportaron Clemente y Monge (2008) para la provincia de Córdoba y Royo y Secanell (2012) en la zona de Resistencia, Chaco. Respecto a los tratamientos no existen diferencias nutricionales entre silaje inoculado y sin inocular.

Tabla 6: *Composición química nutricional en base seca del ensilaje de maíz con y sin inóculo.*

	No inoculado (%)	Inoculado (%)
Materia Seca	30	28,2
Proteína	7,8	8
FDA	26,4	28,8
FDN	46,9	51,7
Cenizas	8,7	9,2
Almidón	14,6	11
Grasa	2,6	2,5

CONCLUSIONES

La inoculación con bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus salivarius*) y *Enterococcus faecium* mejoró la calidad fermentativa y la estabilidad aeróbica en ensilado. Además podemos concluir que a modo experimental el *Zea mays* var. Elena UNLPam presenta buena calidad fermentativa para su utilización como reserva forrajera aún sin la aplicación de un inoculante.

BIBLIOGRAFÍA

1. ARGAMENTERÍA G. A., B. DE LA ROZA, A. MARTINEZ, L. SANCHEZ Y A. MARTINEZ. 1997. El ensilado en Asturias. Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria (CIATA), p. 1-127.
2. ASHBELL G. Y Z.G. WEINBERG. 2001. Ensilaje de cereales y cultivos forrajeros en el trópico. Memorias de la conferencia electrónica de la FAO sobre el ensilaje en los trópicos. Estudio FAO producción y protección vegetal 161, p. 111-119.
3. ASHBELL G., Z. G. WEINBERG, A. AZRIELI, Y. HEN Y B. HOREV. 1990. A simple system to study the aerobic determination of silages. Technical Notes, Canadian Agricultural Engineering, Winnipeg, p.391-393.
4. BAUTISTA, T. G. 2005. Obtención de un inoculante bacteriano para ensilar planta de maíz, Tesis de maestría. Instituto Tecnológico Tuxtla Gutierrez. p 13-37.
5. BAUTISTA, T. G. U.; OLIVA, L. M. A.; RUIZ, S. B.; MENDOZA, N. P.; COBOS, P. M. A.; PÉREZ, S. M. Y GUTIÉRREZ, M. F. 2007. Ensilado de maíz (*Zea mays* L.) usando bacterias productoras de ácido láctico aisladas de la propia planta. *Quehacer científico*. 4:18-22.
6. CAI Y., BENNO Y., OGAWA M., OHMOMO S., KUMAI S. AND NAKASE T. 1998. Influence of *Lactobacillus* spp. From an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. From Forage Crops on Silage Fermentation. 790-8566,4.
7. CÁMARA ARGENTINA DE CONTRATISTAS FORRAJEROS. 2018. Buenos Aires, Argentina. Recuperado de <http://www.ensiladores.com.ar/>.
8. CAÑETE M. V. Y J.L. SACHA. 1998. Ensilado de forrajes y su empleo en la alimentación de rumiantes, p. 1- 260.

9. CHERNEY J.H y D.J.R. CHERNEY. 2003. Assessing Silage Quality. In: Buxton *et al.* Silage Science and Technology. Madison, Wisconsin, USA, p.141-198.
10. CLEMENTE, G. y MONGE, J.L. 2008. Efecto de inoculantes bacterianos en las características de los silajes. Universidad Nacional de Villa María. Córdoba, Argentina.
11. CORCUERA, V.R. & MAGOJA, J.L. 1988. Herencia de la prolificidad en híbridos entre *Teosinte diploperennis* y maíz. .XIX Congreso Argentino de Genética. UNJujuy. Pág.74.
12. DI RIENZO, J. A., F. CASANOVES, M. G. BALZARINI, L. GONZALEZ, M. TABLADA, AND C. W. ROBLEDO. InfoStat versión. 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
13. DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. 1999. *Lactobacillus buchneri* improves aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize silage but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. XII Int. Silage Conf., 264-265. Ed. T. PAULY. Uppsala (Sweden).
14. FERNÁNDEZ-LORENZO B., BARREAL M. L., FLORES G, GONZÁLEZ-ARRÁEZ A., VALLADARES J., PEREIRA, S., CARDELLE M.2008. Efecto de la fecha de cosecha y el uso de inoculantes sobre la calidad fermentativa, la estabilidad aeróbica y la calidad higiénica en ensilados de maíz. Pastos, clave en la gestión de los territorios: integrando disciplinas. p. 337-345. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.
15. FILYA, I. 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal Dairy Science*. 86(11): 3575-3581.

16. GALLARDO M. 2003. Tecnologías para corregir y mejorar la calidad de los forrajes conservados. Circular planteos ganaderos, aapresid.org.ar. EEA INTA Rafaela-Santa fe, p. 51-61.
17. GARCÉS MOLINA A., E. SUÁREZ, J. GUILLERMO Y S. RUÍZ. 2006. Evaluación de la calidad bromatológica del ensilaje de pasto kikuyo y maní forrajero. Revista Lasallista de Investigación. Corporación Universitaria Lasallista, vol. 3, núm. 2, p. 34-37.
18. GUIM A., P. ANDRADE, R. P. ITURRINO-SCHOCKEN, G. L. FRANCO, A. C. RUGGIERI Y E. BRAGA. 2002. Estabilidade aeróbica de silagens de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) emurhecido e tratado com inoculante microbiano. Revista Brasileira de Zootecnia., vol. 31, n 6, p. 2176-2185.
19. HAMMES W.P., WEISS N., HOLZAPFE, W. 1992. The Genera Lactobacillus and Carnobacterium. p. 1535-1594, in, Balows.
20. HOLZAPFEL, W.H., & SCHILLINGER, U. 1992. The Genus Leuconostoc. p. 1508-1534, in: Balows *et al.*, 1992, q.v.
21. JOBIM C. C., L. NUSSIO, R. REIS Y P. SCHMIDT. 2007. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. Revista brasileira de zootecnia, v. 36, suplemento especial, p. 101-119.
22. JOBIM, C.C., REIS, R.A. , RODRIGUES, L.R.D. 1997. Evaluation of the silage of high-moisture corn grain. Pesquisa Agropecuaria Brasileira Volume 32, Pages 311-315.
23. KUNG L., ROBINSON JR., RANJIT NK., CHEN JH., GOLT CM. AND PESEK JD. 2000. Microbial Populations, Fermentation End-Products, and Aerobic Stability

- of Corn Silage Treated with Ammonia or a Propionic Acid-Based Preservative. *Journal of Dairy Science* 83:1479–1486.
24. LISSETTE L. Y RAMÍREZ M. 1989. Análisis de los cambios ocurridos en ensilajes de king grass a nivel de laboratorio y de silos pilotos. *Pastos y Forrajes* Vol. 12, No. 1, p 83-87.
25. McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E., 1991. *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe publications, 340 pp. Bucks (Gran Bretaña).
26. MIER QUIROZ, M.A. 2009. Caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero. Universidad De Córdoba Departamento De Producción Animal.
27. OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C. *et al.* 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and -propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental microbiology*, v.67, p.125-132,
28. PACCAPELO, H. A., MOLAS, M. L. & SALUZZI L. 1999. Aptitud forrajera de líneas S2 originadas del híbrido *Zea mays* L. x *Zea diploperennis* I. *Rev. Facultad de Agronomía de la UNLPam*.
29. PACCAPELO, H.A. 2015. *Journal of Basic & Applied Genetics*. Volumen 26.
30. FIGURINA G., PÉREZ GOMAR E. 1994, momento de cosecha de maíz para ensilar. Editado por la unidad de difusión e información tecnológica del INIA. *Boletín de divulgación* N° 43.
31. RANJIT NK. AND KUNG L. 2000. The Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a Chemical Preservative on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage. *Journal of Dairy Science* 83:526–535.

32. ROMERO L.A. 2014. Forrajes conservados. Manual de actualización técnica. Cámara argentina de contratistas forrajeros. (pág. 66-71).
33. ROYO, L. y SECANELL, E.; 2012. Confección y calidad de silajes. Ediciones INTA Reconquista. Voces y Ecos N° 29. Argentina.
34. SPAROM. D., MALLO R.A. (2001). Evaluación de la flora bacteriana en un ensilado natural de maíz. Revista Argentina de Microbiología. 33: 75-80.
35. TOBIA C., L. URIBE, E. VILLALOBOS, H. SOTO Y I. FERRIS.2003. Aislamiento, selección y caracterización de bacterias ácido lácticas en ensilajes de soya. Revista Agronomía Costarricense, vol.27 (2), p. 21-27.