

Bereterbide, Lucía

*Efecto de la inoculación con *Lactobacillus buchneri* en la calidad nutritiva y la estabilidad aeróbica en ensilajes de maíz, cosechado en tres estados de madurez*

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Bereterbide, L. 2015. Efecto de la inoculación con *Lactobacillus buchneri* en la calidad nutritiva y la estabilidad aeróbica en ensilajes de maíz, cosechado en tres estados de madurez [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.

Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/efecto-inoculacion-lactobacillus.pdf> [Fecha de consulta:.....]



UCA

Facultad de Ciencias Agrarias

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA
ARGENTINA**

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

*“Efecto de la inoculación con Lactobacillus buchneri en la
calidad nutritiva y la estabilidad aeróbica en ensilajes de maíz,
cosechado en tres estados de madurez”.*

**Trabajo final de graduación para optar por el título de:
Ingeniero en Producción Agropecuaria**

Autor: Bereterbide, Lucia

Tutor: Ing. Zootecnista Camarasa Jonatan

Co-tutor: Med. Veterinario Auil Martin

Fecha: 26/06/2015

INDICE

Resumen	página 3
Introducción	página 4
Revisión bibliográfica	página 7
Materiales y Métodos	página 15
Resultados	página 18
Discusión	página 22
Conclusión	página 25
Anexo I	página 26
Anexo II	página 33
Bibliografía	página 37

RESUMEN

El ensilado es el método de conservación de forrajes húmedos más difundido en los sistemas productivos. Recientemente se han desarrollado inoculantes de doble propósito con el fin de lograr una rápida disminución del pH y también una buena estabilidad aeróbica una vez abiertos. Por lo tanto, estos inoculantes contienen tanto bacterias homofermentativas como heterofermentativas. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la inoculación con *Lactobacillus buchneri* a ensilajes de maíz planta entera en distintos estados de madurez sobre la estabilidad aeróbica y el valor nutritivo. El ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino. Se ensiló el maíz en microsilos de 20 L de capacidad inoculados con *Lactobacillus buchneri*. Se realizaron dos tratamientos: inoculado y control, cada uno de ellos con material cosechado con 25, 35 y 45 % de materia seca, con tres repeticiones cada uno. A los 80 días de confección, se abrieron los microsilos y se tomaron diferentes muestras para la evaluación de calidad nutritiva, fermentativa y estabilidad aeróbica. Al final del período de evaluación, se tomó otra muestra para analizar el perfil fermentativo (ácidos acético, propiónico y láctico). Con respecto al efecto inoculado, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas antes y después de la ruptura de la estabilidad aeróbica de los ensilajes de maíz ($P > 0,05$; Cuadro 6, 7, 8 y 9). En cambio, sí se observaron diferencias significativas en algunas de las variables evaluadas debido al efecto del estado de madurez al momento de cosecha. Se concluyó que no hubo efecto del *Lactobacillus buchneri* pero sí se produjo un efecto en el momento de la cosecha sobre la estabilidad aeróbica del ensilaje. A medida que la cosecha se retrasó, la estabilidad aeróbica del ensilaje empeoró, produciendo una mayor pérdida de materia seca.

INTRODUCCION

El ensilaje es el método de conservación de forrajes húmedos más difundido en los sistemas productivos de Argentina y del mundo. Esto es debido a diversos factores tales como: permite mantener la calidad del producto original durante largos períodos de tiempo, en los cultivos de maíz y sorgo permite almacenar gran cantidad de forraje en una sola cosecha, se utiliza para cubrir los baches forrajeros que se producen naturalmente durante el invierno en las pasturas perennes y balancea en forma adecuada las dietas de vacas de carne y de leche en sistemas intensivos.

En los últimos años, se ha producido un aumento sostenido del uso de maíz para ensilaje de planta entera en los sistemas productivos pecuarios. En Argentina, en la campaña 2013/14, se sembraron 4,4 millones de hectáreas (Bolsa de Cereales de Rosario, 2013) de las cuales se estima que hasta el 20% fue destinado a ensilaje de planta entera de maíz (Opacak, 2013). Esto es debido a la continua intensificación que atraviesan los sistemas productivos tanto de carne como de leche.

El ensilaje de maíz representa más del 70% del total de material ensilado en el país (Opacak, 2013). Esto es debido a algunas ventajas propias del maíz para ensilaje como son los altos niveles de producción de materia seca por hectárea, el menor costo de la materia seca ensilada versus otros tipos de reservas, una adecuada concentración energética para balancear dietas y la posibilidad de utilizarlo como única fuente energética en las dietas sin causar trastornos digestivos del tipo de acidosis (Santini, 2004).

La composición química promedio del ensilaje de maíz es $93,1 \pm 6,4$ % de materia orgánica (MO), $7,3 \pm 1,7$ % de proteína bruta (PB), $47,4 \pm 6,7$ % de fibra detergente neutro (FDN), $28,0 \pm 4,2$ de fibra detergente ácida (FDA), $18,0 \pm 7,7$ % de almidón y $61,4 \pm 5,6$ % de digestibilidad, lo cual da como resultado un aporte de energía metabolizable (EM) de $2,2 \pm 0,2$ Mcal EM/kg MS (Guaita y Fernandez, 2005).

Uno de los factores que más influye en la composición química y digestibilidad del ensilaje es el estado de madurez del cultivo al momento de la cosecha (Johnson *et al.*, 1999). No obstante, también depende de otros factores como el tipo de híbrido cultivado y la fecha de siembra (Harrison *et al.*, 1995). El momento óptimo de cosecha para el maíz es cuando el grano posee entre un tercio y dos tercios de línea de leche, ya que en dicho estado se logra un balance entre rendimiento y calidad nutritiva. Además, en dicho momento el porcentaje de materia seca se ubica alrededor del 35%, lo que permite una adecuada compactación del material y suficiente concentración de carbohidratos solubles en agua (CSA). Estos últimos son fermentados por los microorganismos presentes en el cultivo en ácidos orgánicos (láctico, acético y propiónico) y en consecuencia disminuye el pH de la masa ensilada logrando así una correcta conservación.

Cuando la cosecha de maíz se realiza en forma anticipada (estado dentado temprano según escala de Ritchie *et al.*, 1996), el contenido de materia seca es menor al 30%, la concentración de CSA es alta y puede haber pérdidas de nutrientes por lixiviación (Johnson *et al.*, 1999). En general se obtiene un ensilaje con bajo contenido energético debido a la menor acumulación de almidón en el grano (Bal *et al.*, 1997). Además, existe el riesgo de que se produzcan

fermentaciones indeseables como por ejemplo del tipo butírica que provocarán una disminución de la palatabilidad y del consumo voluntario de los animales (Gallardo, 2013).

Cuando la cosecha se atrasa (madurez fisiológica según escala de Ritchie *et al.*, 1982), el contenido de materia seca es mayor al 40% y la concentración de CSA es menor a los valores mínimos necesarios para una correcta fermentación, debido a la translocación que sufren hacia la espiga para la acumulación de almidón en el grano. Además, puede ocurrir una compactación deficiente del material picado, lo que puede afectar el subsecuente proceso fermentativo debido a la presencia de oxígeno (Johnson *et al.*, 1999).

La técnica del ensilaje es un método de conservación de forrajes con alto contenido de humedad cuyo éxito depende básicamente del logro de adecuadas condiciones de acidez y de la preservación en condiciones de anaerobiosis (Jaurena, 2008). La forma natural de conservación de material ensilado requiere de la presencia de carbohidratos simples (CSA) que son transformados en ácidos orgánicos, a través de la fermentación por parte de las bacterias, fundamentalmente lácticas, presentes en forma natural en la planta (Mc Donald *et al.*, 1991). Se sintetizan ácidos grasos que acidifican el material y que, de mantenerse las condiciones de anaerobiosis, evitarán que el forraje se deteriore, inhibiendo el crecimiento de microorganismos indeseables, entre ellos clostridium y enterobacterias (Kung Jr., 2000).

El deterioro aeróbico es una de las principales causas de pérdida de calidad del ensilado de maíz una vez que es abierto para su utilización. Se manifiesta entre otras cosas por el incremento de la temperatura y del pH de la masa ensilada (Contreras-Govea *et al.*, 2009), lo cual se produce debido a la multiplicación de levaduras, primero, y de hongos después, una vez que se reestablecen las condiciones de aerobiosis (Cardelle, 2007). Esto puede evitarse, al menos parcialmente, con el agregado de inóculos bacterianos que se adicionan al momento de confección del silo propiamente dicho.

Actualmente, existen en el mercado varios tipos de inoculantes bacterianos. Algunos de ellos contienen en su formulación únicamente bacterias lácticas homofermentativas que producen ácido láctico, lo cual acelera el proceso fermentativo, pero tiene como desventaja la reducción de la estabilidad aeróbica del material ensilado por la insuficiente producción de ciertos ácidos que tienen acción antifúngicas (Tabacco *et al.*, 2011a). Otro tipo de inoculantes están compuesto únicamente por bacterias heterofermentativas, que contiene como principal bacteria a *Lactobacillus buchneri*. Este tipo de bacteria no solo genera ácido láctico sino que también ácido acético el cual inhibe la proliferación de hongos y levaduras que se desarrollan normalmente una vez que la masa ensilada se expone al oxígeno ambiental.

Recientemente, se han desarrollado inoculantes bacterianos doble propósito, con el fin de lograr no sólo una rápida disminución del pH sino también estabilidad aeróbica una vez abierto el silo (Tabacco *et al.*, 2011b). Por lo tanto, estos inoculantes contienen tanto bacterias homofermentativas como heterofermentativas.

Diversos trabajos demuestran el efecto del ácido acético producido por *Lactobacillus buchneri* sobre el crecimiento de hongos y levaduras cuando el silo es expuesto al oxígeno (Ranjit y Kung, 2000; Filya, 2003). Esto significa que

puede permanecer durante más tiempo expuesto al aire sin deterioro de la calidad nutritiva ni pérdidas de materia seca. Estos trabajos se han conducido en un único estado fenológico o un único porcentaje de materia seca, pero no hay experimentos que indiquen cuál es el efecto de inocular con *Lactobacillus buchneri* cuando el porcentaje de materia seca no es el recomendado.

Con motivo de profundizar el conocimiento del tema, se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino un experimento para probar la siguiente hipótesis:

- La aplicación de inoculante bacteriano con *Lactobacillus buchneri* al ensilaje de maíz de planta entera en distintos estados de madurez comparado con un control permitirá mantener la estabilidad aeróbica por más tiempo.

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del agregado de un inoculante bacteriano con *Lactobacillus buchneri* a ensilajes de maíz planta entera en distintos estados de madurez sobre la estabilidad aeróbica.

REVISION BIBLIOGRÁFICA

ENSILAJE DE MAIZ: IMPORTANCIA

La Argentina está atravesando situaciones de cambios cada vez más frecuentes, con la necesidad de adaptarse a nuevas demandas en cuanto a cantidad y calidad de producto. Esto ha significado en el caso de las explotaciones productoras de carne la modificación del sistema tradicional pastoril puro a sistemas que incluyen la suplementación con granos, forrajes conservados y subproductos de la industria. Por su parte, los sistemas lecheros han incrementado el nivel de suplementación y en algunos casos se han estabulado completamente. Por lo tanto, el productor debe adaptarse a las nuevas demandas, no solamente intensificando su producción con el objetivo de permanecer como tal, sino también aumentando la plasticidad de su sistema (Santini, 2012). Lo anterior trajo aparejado como consecuencia que el maíz para ensilaje haya sido el forraje conservado que más ha crecido en nuestro país. Esta reserva se caracteriza por su gran versatilidad porque puede utilizarse con diferentes objetivos (Santini, 2012): corrección de desbalances nutricionales, disminución de la incidencia de timpanismo, disponibilidad de alimentos ante situaciones adversas, preparación de dietas de animales en alimentación a corral o estabulados con raciones parcialmente mezcladas (PTMR) o totalmente mezcladas (TMR), etc.

En los sistemas productivos pecuarios, el maíz para ensilaje se cosecha en una etapa donde el rendimiento y la calidad son máximos, siendo el objetivo principal de la preservación conservar el valor nutritivo y la cantidad original de forraje durante todo el almacenamiento (McDonald et al., 2002).

Según Cattani *et al.* (2008), el ensilaje de maíz es uno de los forrajes conservados más importante en los sistemas productivos modernos porque presenta altos rindes por hectárea de alto valor energético, es un alimento voluminoso y muy palatable, permite un inmediato almacenaje después del corte con bajos niveles de pérdidas a campo, la cosecha es rápida y el costo de producción de materia seca digestible es bajo, siempre y cuando se trabaje de forma correcta.

VALOR NUTRICIONAL

El valor nutricional del ensilaje depende en primer lugar de la especie ensilada y del momento de cosecha. En segundo lugar de los cambios que ocurren por la actividad enzimática de las plantas y microorganismos durante el período de almacenamiento y el posterior suministro.

En el ensilaje de maíz planta entera, el mayor aporte energético proviene de los carbohidratos no estructurales, esencialmente del almidón contenido en los granos. Esto es debido a que la digestibilidad de los granos ensilados es mayor al 90% y a que representan más del 40% del peso seco de la planta entera. Los carbohidratos estructurales (FDN: celulosa, hemicelulosa y lignina) en su mayoría se encuentran en tallos y hojas y presentan una digestibilidad del 49% (% FDN) comparada con la digestibilidad de la MS de la planta total que es del 65% (Elizalde, 1990). Esto es debido principalmente a su baja tasa de digestión (Elizalde y otros, 1993).

FASES DEL ENSILAJE

El silaje es un proceso que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea en condiciones anaeróbicas. Las bacterias ácido lácticas fermentan los CSA del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado disminuye a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción. El oxígeno es dañino para el ensilaje, ya que permite la respiración de la planta y el crecimiento de los microorganismos aeróbicos, tales como levaduras y mohos, que deterioran la calidad de la masa ensilada y ocasionan pérdidas de materia seca (Woolford, 1990).

Los procesos bioquímicos y microbiológicos durante la fermentación del ensilado se pueden dividir en cuatro etapas:

- 1- Fase aeróbica:** dura pocas horas y el pH es aún elevado (6,0 a 6,5). El oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los microorganismos aerobios y aerobios facultativos como las levaduras y enterobacterias. Además, hay actividad de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas, siempre que el pH se mantenga en el rango neutral. Una rápida remoción del aire en esta fase es importante porque previene el crecimiento indeseable de bacterias aeróbicas, que compiten por el sustrato con bacterias benéficas (Kung, Jr., 2000).

Las levaduras son microorganismos anaerobios, cuya presencia en el ensilaje es indeseable porque bajo condiciones de anaerobiosis fermentan los azúcares simples produciendo etanol y dióxido de carbono. Además, en condiciones aerobias muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico en dióxido de carbono y agua, lo que eleva el valor del pH del ensilaje, permitiendo el desarrollo de otros microorganismos indeseables. Las enterobacterias son organismos anaerobios facultativos, su desarrollo en el ensilaje es perjudicial porque compiten con las bacterias ácido lácticas por los azúcares disponibles y porque degradan las proteínas. La degradación proteica causa una reducción del valor nutritivo del ensilaje y genera compuestos tóxicos.

Los *Bacillus sp.* son bacterias aerobias facultativas que forman esporas. Fermentan un amplio rango de carbohidratos produciendo ácidos orgánicos (acético, láctico y butírico). Algunas especies de *Bacillus* producen sustancias fungicidas y se los ha utilizado para inhibir el proceso de deterioro aeróbico en ensilajes, pero con excepción de estas especies, el desarrollo de los *Bacillus* en el ensilaje es considerado como indeseable.

- 2- Fase de fermentación:** se inicia al producirse un ambiente anaerobio. Si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad de las bacterias ácido lácticas proliferará y se convertirá en la población predominante. Debido a la producción y acumulación de ácidos orgánicos y principalmente de ácido láctico, el pH disminuirá a valores entre 5,0 a 3,8, dependiendo de la composición de la planta y su capacidad de amortiguación (buffer).

Las bacterias que producen ácido láctico pertenecen a la microflora epifítica de los vegetales. Las bacterias lácticas que se asocian con el proceso de ensilaje pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. La mayoría de estas son mesófilas, o sea que pueden crecer en un rango de temperatura que oscila entre 5 y 50 °C, con un óptimo entre 25 y 40 °C.

Son capaces de disminuir el pH del ensilaje a valores entre 4 y 5, dependiendo de las especies y del tipo de forraje (Elferink *et al.*, 2001).

- 3- **Fase estable:** debido a los valores bajos de pH la mayoría de los microorganismos de la fase de fermentación disminuyen su actividad. Algunos organismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo; otros como clostridios y bacilos sobreviven como esporas. Solo algunas proteasas, carbohidrasas y microorganismos especializados, como *Lactobacillus buchneri* que toleran ambientes ácidos, continúan activos pero a menor tasa de crecimiento.
- 4- **Fase de deterioro aerobio:** ocurre en todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire para su uso. No obstante puede ocurrir antes de la apertura por daño de la cobertura del silo. El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. Esto aumenta el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro, en ella se constata un aumento de la temperatura y la actividad de los microorganismos que deterioran el ensilaje, los bacilos. La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aerobios, también facultativos, como mohos y enterobacterias. Los mohos son organismos aerobios cuya presencia en el ensilaje se detecta por la aparición de filamentos de diversos colores, de acuerdo a las especies presentes. Se desarrollan en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno. En un buen ensilaje la presencia de mohos solo se constata al inicio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior de la masa ensilada, pero durante la fase del deterioro aerobio todo el ensilaje puede ser invadido por mohos. Los mohos disminuyen el valor nutritivo y la palatabilidad del ensilaje, y también son un riesgo para la salud de los animales por la formación y acumulación de micotoxinas (Elferink *et al.*, 2001).

FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO DEL ENSILAJE

Según Kung Jr (2001) los factores que afectan favorablemente la fermentación y calidad del forraje son:

- ✓ Adecuado contenido de humedad del forraje cuando se ensila
- ✓ Rápido llenado del silo
- ✓ Compactación adecuada del material en el silo
- ✓ Sellado del silo para disminuir la exposición al aire
- ✓ Rápida remoción del aire
- ✓ Rápida producción de ácido láctico que produce un rápido descenso del pH
- ✓ Exclusión continua del aire del silo durante el almacenaje y el suministro

A lo anterior hay que sumarle dos factores importantes intrínsecos al cultivo: los carbohidratos solubles en agua y la capacidad buffer.

1- CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN AGUA (CSA)

Los microorganismos usan los CSA como la principal fuente de energía para su desarrollo y crecimiento. Los principales CSA de las plantas son la fructosa, sacarosa y fructosanos.

El maíz tiene un contenido suficiente de CSA para lograr una correcta fermentación durante el proceso de ensilado, lo que lo convierte en un excelente

material para ensilar. El nivel mínimo necesario de CSA en el forraje a ensilar oscila entre los 60 a 80 g/kg de MS (Fisher y Burns, 1987). Este valor es superado a partir del estado de grano lechoso en el maíz, sorgo granífero, avena, cebada y trigo. En las pasturas mixtas (leguminosas y gramíneas), ese nivel de CSA se alcanzaría solo en primavera.

A medida que la planta de maíz madura, los CSA formados en las hojas y tallos son transferidos a la espiga y almacenados en el grano. Durante este período, la proporción de grano en el total de la producción de materia seca del cultivo se incrementa (Wilkinson, 1978), observándose pequeños cambios en la digestibilidad de la planta entera (Kilkenny, 1978).

2- CAPACIDAD BUFFER

La capacidad buffer es definida como la resistencia que presenta la planta a las variaciones de pH. La capacidad depende básicamente de la composición de la planta en cuanto a proteína bruta, iones inorgánicos (Ca, K, Na) y la combinación de ácidos orgánicos (Jobim *et al.*, 2007). A mayor capacidad buffer más ácido láctico será necesario que se forme en el ensilado para poder alcanzar el pH óptimo de 4, y mayor cantidad de azúcares fermentados será necesaria para poder proporcionar dicho ácido láctico (Jobim *et al.*, 2007).

Los cultivos de maíz y sorgo a diferencia de otros, como la alfalfa y los tréboles, son ricos en CSA y tienen una menor resistencia al descenso del pH (capacidad buffer) durante la fermentación en el ensilado.

PERDIDAS OCURRIDAS EN LOS ENSILAJES

Las pérdidas que se producen en el proceso de confección, almacenaje y apertura del silaje pueden clasificarse en dos tipos: inevitables y evitables (Tabla 1). Estas últimas son las más importantes, pudiendo representar más del 62,5% del total y están representadas principalmente por el deterioro aeróbico durante el almacenamiento y la apertura del silo (adaptado de Zimmer, 1980).

Tabla 1. Pérdida de energía en el ensilaje y factores que las causan

Proceso	Clasificación	Pérdidas, %	Factores causales
Respiración residual	Inevitables	1-2	Enzimas de las plantas
Fermentación	Inevitables	2-4	Microrganismos
Efluentes o pérdidas a campo o por pre-oreo	Mutuamente evitables	5->7 o 2->5	Contenido de material seca bajo, el tiempo, técnica y características de los cultivos
Fermentación secundaria	Evitable	0->5	Capacidad buffer; Contenido de material seca bajo
Deterioro aeróbico durante el almacenamiento	Evitable	0->10	Tiempo de llenado y nivel de compactación, cierre y susceptibilidad del cultivo
Deterioro aeróbico después de la apertura	Evitable	0->15	Idem anterior, contenido de material seca, estación del año, forma y tasa de extracción
Total		7->40	

En el trabajo de Ohyama *et al.*, (1980; Tabla 2) analizaron cincuenta ensilajes y observaron que dentro de las variables bioquímicas y microbianas que mayor significancia tienen en el aumento de la temperatura una vez abierto el silo están el contenido de materia seca, ácido acético, ácido butírico y las levaduras. Los valores de correlación negativos para materia seca y levaduras indican que los valores más altos de estas variables están asociados a un menor tiempo en que la temperatura se eleve una vez abierto el silo. Por el contrario, los valores de correlación positivos de ácido acético y butírico indican que las concentraciones más altas de estos productos de la fermentación se asociaron con ensilajes que eran relativamente estables al estar en contacto con el aire.

Tabla 2. Correlaciones (valores r) entre variables determinadas en ensilajes inmediatamente después de su apertura y el tiempo para elevarse la temperatura posterior a la exposición al aire (Ohyama *et al.*, 1980).

Variables en la apertura del silo	Correlación con el tiempo para que la temperatura se eleve durante la exposición al aire
Materia seca	-0,47**
Ph	-0,16
Acido láctico	0,17
Acido acético	0,44**
Acido butírico	0,36**
CSA ¹	0,08
Levaduras	-0,58**
Mohos	0,29*
Bacterias	0,29*

¹CSA: Carbohidratos solubles en agua; Significancia: * p <0,05; ** p <0,01.

MOMENTO DE COSECHA

El momento en que se cosecha el cultivo de maíz para ensilaje puede afectar la producción de forraje, la composición morfológica de la planta y la calidad del forraje. No obstante, la digestibilidad total de la planta no varía mayormente en cuanto al momento de cosecha. El grano de maíz permite un período amplio de cosecha, que abarca desde lechoso hasta grano duro. Por su parte, mientras el tallo se conserve verde contiene un alto nivel de azúcares, que permitirá una fermentación adecuada con la generación de ácido láctico en el ensilaje (McDonald *et al.*, 2002).

Trabajos realizados en Argentina por Scheneiter y Carrete (2004) señalan que el momento de cosecha óptimo es cuando la línea de leche se encuentra en la mitad del grano, aproximadamente 35 días después de floración. Si la cosecha es temprana o en estado precoz (menos de 25% de materia seca en la planta entera) no se alcanzaría el rendimiento máximo de forraje y aumentaría el riesgo de pérdidas de nutrientes por lixiviación, por el elevado contenido de agua (Johnson *et al.*, 1999). Cuando la cosecha es tardía o se atrasa, el rendimiento de materia seca es máximo, pero puede comprometerse en algunos híbridos la calidad del ensilaje y tener dificultades en la compactación. Esto último puede provocar fermentaciones pobres que no alcanzan a disminuir el pH lo suficiente como para lograr una buena conservación (Scheneiter y Carrete, 2004).

INOCULANTES Y TIPOS

El principal objetivo del ensilaje es conservar la cantidad y la calidad original del cultivo cosechado, tanto como sea posible. Para este fin se aplican diferentes tecnologías como los inoculantes bacterianos que modulan el proceso fermentativo hacia la producción de ácido láctico como principal producto de la fermentación (Wilkinson y Davies, 2012).

En la actualidad existen en el mercado dos tipos de inoculantes bacterianos. Uno de ellos contiene únicamente en su composición bacterias

homofermentativas que producen ácido láctico y disminuyen el pH de la masa ensilada. Por lo tanto, aceleran el proceso fermentativo y garantizan una rápida y eficiente fermentación en el ensilaje logrando así una adecuada conservación (Muck y Kung, 1997). Sin embargo, tienen como desventaja la reducción de la estabilidad aeróbica¹ del material ensilado (Kung Jr, 2000; Tabacco, *et al.*, 2011 a).

El otro tipo de inoculantes está compuesto por bacterias heterofermentativas, como *Lactobacillus buchneri*, que genera no solo ácido láctico sino que también ácido acético. Este último inhibe la proliferación de hongos y levaduras, que son los responsables del deterioro de la calidad nutritiva una vez abierto y expuesto el silo al aire (Contreras-Govea *et al.*, 2009).

Recientemente, se han desarrollado inoculantes bacterianos doble propósito o multicepa con el objetivo de lograr no solo una rápida disminución del pH sino que también buena estabilidad aeróbica una vez abierto el silo (Tabacco *et al.*, 2011b). Por lo tanto, estos inoculantes contienen en su composición tanto bacterias homofermentativas como heterofermentativas.

Durante la fermentación, en ensilajes inoculados con bacterias homofermentativas, se produce una rápida disminución de la acidez y un bajo pH al final, lo que permite inhibir las bacterias Clostridiales, responsables de la producción de ácido butírico. Normalmente, se producen bajas concentraciones de ácido acético, butírico y etanol, lo cual mejora la recuperación de materia seca en un 2 a 3 % comparado con ensilajes inoculados con bacterias exclusivamente heterofermentativas. Además, los inoculantes homofermentativos podrían mejorar el desempeño animal en un 3 a 5 % (Muck y Kung, 1997). Por su parte, *Lactobacillus buchneri* permite lograr mayor estabilidad aeróbica del material una vez expuesto al aire, retrasando el calentamiento producido por la actividad de los microorganismos indeseables.

ESTABILIDAD AEROBICA

La estabilidad aeróbica se define como el tiempo en que el ensilaje permanece estable sin alterar sus características físicas y químicas en contacto con el aire. Cuando se rompe la estabilidad aeróbica se produce un deterioro, porque los productos de la fermentación, como el ácido láctico, son utilizados como sustratos para el crecimiento microbiano cuando el oxígeno se reintroduce en la masa ensilada. En la mayoría de los ensilajes que presentan deterioro aeróbico hay un aumento significativo de la temperatura por encima de la temperatura ambiente, como resultado de la oxidación microbiana de los ácidos orgánicos y CSA a dióxido de carbono y agua (Pahlow *et al.*, 2003).

¹ La estabilidad aeróbica es el número de horas que los ensilajes mantienen la temperatura antes de elevarse más de 2°C por encima de la temperatura ambiente (Taylor y Kung Jr., 2002).

MATERIALES Y METODOS

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental Agropecuaria, INTA Pergamino (33° 34' S, 60° 34' O y 66 m snm), provincia de Buenos Aires. Sobre un suelo Argiudol típico (franco-limoso), serie Pergamino, capacidad de uso IIe (fase moderadamente erosionada); clima templado húmedo, temperatura media anual de 16,5 °C y lluvias medias anuales de 970 mm.

El cultivo de maíz fue implantado en siembra directa el 11 de diciembre del 2013 y se utilizó el híbrido simple de maíz AX882 HCL/MG. La siembra se realizó con una maquina Giorgi Precisa 8000 a una distancia entre surcos de 52,5 cm y a una densidad de 76.000 semillas/ha. La fertilización se realizó a la siembra con 160 kg/ha de urea y 80 kg/ha de fosfato de di-amonio. Se realizaron controles de plagas y malezas durante todo el ciclo del cultivo.

El cultivo se cosechó en tres momentos distintos: el primero fue con 25 % de materia seca (MS), luego con 35% MS y por último con 45% MS. Para determinar el porcentaje de humedad se cortaron cada semana, a partir de grano pastoso, 5 plantas y fueron secadas durante 48 horas a 60 °C. Luego con el valor de peso seco y el valor de peso húmedo se calculó el porcentaje de MS.

Para la cosecha y el picado, se utilizó una cosechadora experimental de parcelas, *Cibus F de Wintersteiger*, diseñada especialmente para la cosecha de cultivos (maíz, sorgo, pasturas y verdes) para ensilar. La misma consta de un cabezal recolector (rotor), luego las cuchillas picadoras y finalmente un receptáculo con cinta transportadora y balanza. El ancho de trabajo es de 1,4 metros.

Se recolectaron y picaron en cada momento 80 plantas, la mitad de este material fue inoculado a una dosis de 2 g de producto² por tonelada de material fresco con 166,7 ml de agua destilada. En el tratamiento control también se aplicó la misma cantidad de agua, como placebo. Tanto el inoculante como el agua destilada fueron asperjados con un rociador manual.

Luego se realizó el ensilaje en baldes plásticos con una capacidad de 20 L (micro-silos). El material fue colocado en capas superpuestas compactadas manualmente y una vez completado cada balde se cerró con una tapa plástica quedando sellados herméticamente durante todo el período de almacenaje. Los micro-silos fueron llenados con aproximadamente 7 kg de material fresco y los mismos fueron pesados y muestreados en el momento inicial y final para estimar las pérdidas de MS.

Los tratamientos quedaron constituidos de la siguiente manera: 1) Control 25% MS (sin inóculo bacteriano); 2) Inoculado 25% MS; 3) Control 35% MS (sin inóculo bacteriano); 4) Inoculado 35% MS; 5) Control 45% MS (sin inóculo bacteriano); 6) Inoculado 45% MS. Se realizaron tres repeticiones en cada estado de madurez.

²El producto utilizado para inocular es un inoculante multicepa, o sea que contiene en su composición microorganismos tanto homofermentativos como heterofermentativos, con un contenido mínimo de bacterias no menor a $7,5 \times 10^{10}$ UFC (unidades formadoras de colona) siendo estas *Lactobacillus buchneri*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum*.

Aproximadamente a los 80 días de confección, los micro-silos fueron abiertos y a continuación se extrajeron tres muestras de cada uno de ellos, sobre las que se realizaron las determinaciones de materia seca, calidad fermentativa y estabilidad aeróbica. De las tres repeticiones de cada tratamiento, se tomó una muestra de cada uno y se realizó un pool y se analizó su composición química (FDN, FDA, PB y N-NH₃). Para la determinación de materia seca, la muestra se secó en estufa a 60 °C durante 48 horas o hasta peso constante. Para la determinación de FDN y FDA, se utilizó el método de Goering y Van Soest (1970) y se realizó mediante el analizador de fibra ANKOM²²⁰ (ANKOM Technology Corporation, Faiport, NY). Para la determinación de PB, el método utilizado fue Kjeldahl AACC 46-129 (1995).

Para los análisis de ácidos orgánicos, carbohidratos solubles en agua (CSA), pH y N-NH₃ se tomaron aproximadamente 250 gramos de material ensilado, al inicio cuando se abrieron los micro-silos y al final del experimento (después que rompieron la estabilidad aeróbica). Los ácidos orgánicos que se determinaron en el laboratorio fueron ácido láctico, ácido acético, ácido propionico y ácido butírico. La metodología utilizada fue por Cromatografía Gaseosa, donde inicialmente se realiza una purificación con ácido orto fosfórico al 25% en ácido sulfúrico 0,5 M, a razón de 0,5 ml cada 2 ml de muestra, y luego se centrifuga por 10 minutos a 10.000 rpm (Friggens *et al.*, 1998). El equipo que se utilizó fue Konik 5000B con auto-muestreador Robokrom GC.

La estabilidad aeróbica se define como el número de horas en que el material ensilado se mantiene a una temperatura estable. Se define como ruptura o pérdida de estabilidad aeróbica cuando la temperatura de la masa ensilada se eleva más de 2 °C por encima de la temperatura ambiente (Taylor y Kung Jr., 2002).

Para determinar la estabilidad aeróbica se utilizó la metodología propuesta por Basso *et al.* (2012). Se colocaron 3 kg del material ensilado fresco en una bandeja plástica de 40 cm de largo por 30 cm de ancho y una altura de 10 cm. Las mismas fueron colocadas en una habitación con temperatura controlada a 20 °C. El tiempo máximo estimado para romper la estabilidad aeróbica fue de 12 días consecutivos, en los cuales se midió la temperatura (Termómetro Digital Thermo; -50 a 70 °C; +/- 1°C) cada 6 horas (9 hs, 15 hs, 21 hs y 3 hs) en el centro de la masa ensilada y también se midió la temperatura ambiente cerca de las bandejas.

Durante el período de evaluación de la estabilidad aeróbica, también se tomaron muestras cada 12 horas para la determinación de pH. Para esto se utilizó un peachimetro portátil *pH Agrar 2000*. Se colocaron aproximadamente 10 g de muestra en 100 ml de agua destilada y se dejaron en la heladera en un envase tapado durante 12 h. Luego se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 h, para recién después realizar la medición con el peachimetro.

Tabla 3. Momentos en que se tomaron las distintas muestras para diferentes determinaciones.

Determinaciones	Apertura	9 hs	15 hs	21 hs	3 hs	Final
Peso de los micro-silos	X					X
MS	X					
Composición química	X					
Características organolépticas	X					
Calidad fermentativa	X					X
Temperatura	X	X	X	X	X	X
Ph	X	X		X		X

El diseño estadístico fue un diseño factorial con tres repeticiones. Los factores fueron: momento de cosecha e inoculado; el primero con tres niveles: 25, 35 y 45% MS y el segundo con dos niveles: control e inoculado.

Para el análisis estadístico se empleó el Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010). El modelo lineal fue el siguiente:

$$Y_{ijk} : \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : variable respuesta al i-ésimo momento de cosecha en el j-ésimo nivel inoculado

μ : media general del experimento

α_i : efecto del i-ésimo momento de cosecha (para $i= 1, 2$ y 3)

β_j : efecto del j-ésimo nivel inoculado (para $j: 1$ y 2)

$(\alpha\beta)_{ij}$: efecto de la interacción momento de cosecha (i) por inoculado (j)

ε_{ij} : error experimental aleatorio correspondiente al i-ésimo momento de cosecha en

el j-ésimo nivel inoculado.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos o tendencias cuando la posibilidad del error tipo I fue menor al 5% o entre el 5 y 10%, respectivamente.

RESULTADOS

El porcentaje de MS de los diferentes ensilajes se encontró dentro del rango de valores objetivo planteado para cada estado de madurez (Tabla 4).

Con respecto a la calidad nutricional, los valores de FDN y FDA fueron en promedio de $39,5 \pm 4,4$ % y $21,6 \pm 3,0$ % respectivamente, mientras que la DIVMS fue en promedio de $65,4 \pm 1,0$.

Tabla 4. Valores expresados en porcentajes de MS, FDN, FDA, PB y DIVMS de los ensilajes de maíz en los distintos estados de madurez.

Tratamiento	Estados de madurez (%MS)	FDN	FDA	PB	DIVMS	
Control	25 %	25.1	43,8	24,8	7,3	65,9
Control	35 %	35.4	35,1	19,2	6,9	66,5
Control	45 %	43.2	41,2	21,9	6,6	64,1
Inoculado	25 %	25.1	42,9	24,3	7,4	65,5
Inoculado	35 %	35.4	40,9	22,4	6,4	64,4
Inoculado	45 %	43.3	33,1	17,1	6,9	65,9

Debido a que para todas las variables evaluadas la interacción estado de madurez * inoculado no fue significativa ($P > 0,05$; Tabla 5, 6, 7 y 8), se presentan los efectos principales de cada factor, algunos significativos y otros no.

Con respecto al efecto inoculado, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas antes y después de la ruptura de la estabilidad aeróbica de los ensilajes de maíz ($P > 0,05$; Tabla 5, 6, 7 y 8). En cambio, sí se observaron diferencias significativas en algunas de las variables evaluadas debido al efecto del estado de madurez al momento de cosecha.

La concentración de N-NH₃ fue similar ($P > 0,05$; Tabla 5) para los ensilajes con distintos estados de madurez. En promedio fue de $0,06 \pm 0,02$ % y $0,05 \pm 0,03$ %, antes y después de la ruptura de la estabilidad aeróbica, respectivamente.

Los niveles de CSA fueron diferentes en los distintos estados de madurez, siendo mayor en los ensilajes con 25% MS con respecto a los ensilajes con 35 y 45% de MS ($P < 0,05$). Antes de la ruptura de la estabilidad aeróbica, dicha diferencia fue del 98% mientras que después de la ruptura fue del 153% (25 vs 35 y 45 % MS).

La concentración de ácido acético fue diferente entre los ensilajes antes de la ruptura de la estabilidad aeróbica ($P < 0,05$), mientras que no se observaron diferencias significativas una vez que los ensilajes rompieron la estabilidad ($0,07 \pm 0,04$ %). Los ensilajes con 25% MS presentaron la mayor concentración de ácido acético, siendo esta diferencia del 58% con respecto a los ensilajes con 35% MS. A su vez, estos últimos presentaron mayor concentración con respecto a los ensilajes con 45% MS, siendo la diferencia del 44%.

Al igual que el ácido acético, la concentración de ácido propionico fue diferente entre los ensilajes antes de la ruptura de la estabilidad aeróbica ($P < 0,05$), mientras que no se observaron diferencias significativas una vez que los ensilajes rompieron la estabilidad ($0,06 \pm 0,05$ %). En los estados de madurez 25 y

35% MS los niveles de ácido propionico fueron un 85% mayor con respecto al estado con 45% MS ($P < 0,05$).

El contenido de ácido butírico antes de romper la estabilidad aeróbica no fue detectable, ni en los tratamientos inoculados ni en los diferentes estados de madurez. Después de la ruptura de la estabilidad aeróbica sí fue detectable pero no se encontraron diferencias significativas entre los tres estados de madurez ($0,05 \pm 0,02$ %).

La concentración de ácido láctico fue diferente entre los ensilajes antes de la ruptura de la estabilidad aeróbica ($P < 0,05$). Los ensilajes con 25% MS presentaron la mayor concentración de ácido láctico, siendo esta diferencia del 29% con respecto a los ensilajes con 35% MS. A su vez, estos últimos presentaron mayor concentración con respecto a los ensilajes con 45% MS, siendo la diferencia del 18%. No se observó efecto del estado de madurez sobre la concentración de ácido láctico luego de la ruptura de la estabilidad aeróbica. No obstante, para el estado de madurez 45% MS, se observó una concentración de 5,31% mientras que para los otros dos estados no fue detectable.

Finalmente, la concentración de ácidos totales de los ensilajes antes de la ruptura de la estabilidad aeróbica guardó relación con la concentración de los ácidos en particular. O sea, los ensilajes con 25% MS presentaron la mayor concentración de ácidos totales, siendo esta diferencia del 47% con respecto a los ensilajes con 35 y 45% MS ($P < 0,05$). Una vez que los ensilajes rompieron la estabilidad, se observó una tendencia ($P < 0,10$) sobre los niveles de ácidos totales, siendo la concentración en el estado de madurez 45% MS un 1305 % mayor con respecto a 25 y 35% MS ($P < 0,05$).

Tabla 5. Efecto de los tratamientos inoculados y de los tres estados de madurez sobre nitrógeno amoniacal (N-NH₃), carbohidratos solubles en agua (CSA), ácidos acético (C₂), propionico (C₃), butírico (C₄), láctico y totales, antes y después de la ruptura de la estabilidad aeróbica.

Item	Tratamientos		Estados de madurez			Significancia
	Control	Inoculado	25 %	35 %	45 %	
N-NH ₃ antes, %	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	ns
N-NH ₃ después, %	0,07	0,04	0,05	0,05	0,07	ns
CSA antes, %	0,63	0,69	0,99 a	0,54 b	0,46 b	*
CSA después, %	0,68	0,65	1,11 a	0,44 b	0,44 b	*
C ₂ antes, %	1,79	1,83	2,63 a	1,66 b	1,15 c	*
C ₂ después, %	0,08	0,06	0,09	0,08	0,05	ns
C ₃ antes, %	0,33	0,30	0,37 a	0,37 a	0,20 b	*
C ₃ después, %	0,06	0,07	0,09	0,06	0,04	ns
C ₄ antes, %	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	ns
C ₄ después, %	0,05	0,05	0,04	0,05	0,07	ns
Láctico antes, %	8,42	7,86	10,03 a	7,80 ab	6,59 b	*
Láctico después, %	5,54	4,85	Nd	Nd	5,31	ns
Ácidos totales antes, %	10,54	9,98	13,02 a	9,82 b	7,94 b	*
Ácidos totales después, %	1,40	0,69	0,20 a	0,19 a	2,74 b	**

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (* $P < 0,05$; ** $P < 0,10$). ns= no significativo; nd= no detectable.

En la tabla 6 se observan los valores de pH de los ensilajes al momento de la apertura, al comienzo de la evaluación de la estabilidad aeróbica y una vez ocurrida la ruptura de la misma. Al momento de la apertura, los ensilajes confeccionados con 45% MS presentaron el mayor valor de pH, siendo éste un 5 y 10% mayor con respecto a los ensilajes con 25 y 35% MS, respectivamente ($P < 0,05$). Por su parte, los ensilajes con 25% MS presentaron un valor de acidez 5% superior con respecto a los ensilajes con 35% MS.

El valor del pH de los ensilajes antes de romper la estabilidad aeróbica fue mayor para el estado de madurez 45% MS con respecto a los otros dos estados (8% mayor; $P < 0,05$). En cambio, una vez ocurrida la ruptura de la estabilidad, los ensilajes con menores porcentajes de MS presentaron mayores valores de pH con respecto al estado con 45% MS (38 % mayor; $P < 0,05$).

Tabla 6. Efecto de los tratamientos inoculados y de los tres estados de madurez sobre el pH en el ensilaje, antes y después de la ruptura de la estabilidad aeróbica.

Item	Tratamientos Inoculados		Estados de madurez			Significancia
	Control	Inoculado	25 %	35 %	45 %	
pH ensilaje	3,84	3,86	3,85 b	3,68 c	4,03 a	*
pH antes	3,94	4,02	3,87 b	3,90 b	4,20 a	*
pH después	6,41	6,32	6,63 a	7,38 a	5,08 b	*

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (* $P < 0,05$).

En la tabla 7 se observa el efecto del inoculado y estado de madurez sobre la estabilidad aeróbica y la temperatura de los ensilajes de maíz. La temperatura promedio del ambiente durante el experimento fue de $22,2 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, lográndose así la temperatura propuesta para evaluar la estabilidad de los ensilajes una vez abiertos.

Con respecto a la estabilidad aeróbica propiamente dicha, los ensilajes confeccionados con 25% MS fueron más estables con respecto a los ensilajes con 35 y 45% MS, siendo esta diferencia del 115% ($P < 0,05$). Los ensilajes con 25% MS también necesitaron más horas hasta alcanzar la temperatura máxima, siendo un 110% mayor con respecto a los ensilajes con 35 y 45% MS ($P < 0,05$). Por su parte, la temperatura máxima la alcanzó el ensilaje confeccionado con 35% MS, siendo un 19% mayor con respecto a los ensilajes con 25 y 45% MS ($P < 0,05$).

Tabla 7. Efecto de los tratamientos inoculados y de los estados de madurez sobre la ruptura de la estabilidad aeróbica, las horas en alcanzar la temperatura máxima, temperatura máxima y promedio de temperatura del experimento.

Item	Tratamientos Inoculados		Estados de madurez			Significancia
	Control	Inoculado	25 %	35 %	45 %	
E.A ¹ , hs	79,3	70,0	116,0 a	59,0 b	49,0 b	*
T. máx ² , hs	88,7	75,3	126,0 a	67,0 b	53,0 b	*
T. máx., °C	30,4	29,8	28,6 b	33,7 a	27,9 b	*
T. prom. ³ , °C			22,0	21,5	23,3	

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (* $P < 0,05$).

¹E.A.= estabilidad aeróbica; ² T max= temperatura máxima; ³ T. promedio = temperatura promedio durante todo el experimento.

Finalmente se observó un efecto significativo del estado de madurez sobre las pérdidas de materia seca. Estas pérdidas fueron un 23% mayores en los ensilajes confeccionados con 45% MS con respecto a los ensilajes con 25 y 35% MS (Tabla 8; $P < 0,05$).

Tabla 8. Efecto de los tratamientos inoculados y de los estados de madurez sobre la pérdida de materia seca.

	Tratamientos Inoculados		Estados de madurez			Significancia
	Control	Inoculado	25 %	35 %	45 %	
Perdidas MS, %	14,5	14,3	13,6 b	13,2 b	16,5 a	*

Letras distintas indican diferencias significativas (* $P < 0,05$).

DISCUSION

Las concentraciones promedio de FDN y FDA de los ensilajes de maíz decrecieron a medida que progresó el estado de madurez del cultivo al momento de la cosecha. Johnson *et al.* (2001) confirman que las concentraciones de fibra son mayores en los primeros estadios de madurez y que existe una tendencia a concentraciones menores en los estadios tardíos. Por otro lado, los valores absolutos observados en este trabajo fueron inferiores a los informados por Fernández Mayer (1999), Acosta Aragón (2012) y Kung (2012). En el trabajo de Acosta Aragón (2012), los ensilajes de maíz se confeccionaron con 32,3% MS y los valores de FDN y FDA fueron 43,9 y 22,8%, respectivamente.

No se observaron diferencias numéricas en la DIVMS entre los ensilajes inoculados y control ni tampoco con el avance del estado de madurez al momento de la cosecha. Los valores de digestibilidad de este trabajo son altos si se los compara con los informados por Jiménez *et al.* (2005) para ensilaje de maíz (63,2%). Altos valores de digestibilidad incrementan el consumo de los animales, lo cual en definitiva favorece el aporte de nutrientes para el crecimiento y mejora la productividad animal (Russell *et al.*, 1992).

El porcentaje promedio de PB en este estudio fue de 6,9%, valor inferior a los informados por Guaita y Fernández (2005), Acosta Aragón (2012) y por Carvalho Basso (2012). Estos autores reportaron valores de 7,3, 8,4 y 10,5%, respectivamente. La concentración proteica disminuye a medida que progresa el estado de madurez del cultivo debido a un efecto de dilución por el aumento del rendimiento de materia seca (Bal *et al.*, 1997, 1009; Johnson *et al.*, 2001).

Debido a que ninguna de las variables de calidad fermentativa de los ensilajes de maíz tratados con inoculante multicepa fue afectada, a lo largo de la discusión se argumenta principalmente el efecto del estadio de madurez sobre dichas variables. La alta concentración de ácido acético observada en el tratamiento control probablemente explique la ausencia del efecto del inoculante observada por otros autores. Filya (2003) observó diferencias significativas entre el tratamiento control y el inoculado con *Lactobacillus buchneri*, pero a diferencia del presente trabajo, la concentración de ácido acético fue de 1,1 y de 2,1%, respectivamente. O sea, la concentración de ácido acético en el control del trabajo de Filya (2003) fue menor con respecto al presente trabajo y el tratamiento inoculado fue similar al tratamiento control del presente trabajo. Del mismo modo, Nkosi *et al.* (2011) observaron bajas concentraciones de ácido acético en el tratamiento control (0,79%)

No se observaron diferencias significativas en los valores de N-NH₃ a medida que progresó el estado de madurez del cultivo. El nitrógeno amoniacal refleja el grado de degradación de las proteínas durante el proceso fermentativo (Wilkinson, 2005) y niveles bajos indican silos bien preservados (Mc Donald *et al.*, 2002). Según Ojeda *et al.* (1991), en los ensilados bien conservados se considera como óptima una concentración menor del 7% de N-NH₃.

La concentración de CSA disminuyó a medida que avanzó el estado de madurez, posiblemente debido a una translocación de los mismos hacia los granos y posterior conversión en almidón. Los CSA fueron utilizados por bacterias para fermentar y producir ácidos y así lograr un correcto valor de pH y, por lo tanto, una adecuada conservación. Los ensilajes con 35 y 45% MS presentaron menores

concentraciones de CSA con respecto a los ensilajes con 25% MS. Según Vieira da Cunha (2009), para que un ensilaje logre una buena conservación debe presentar una concentración alrededor del 6-8% de CSA.

La concentración de ácido acético varió según el estado de madurez del cultivo, siendo la concentración mayor en los ensilajes confeccionados con 25% MS. Según Filya (2003), los ensilajes confeccionados con cultivos en estadios de madurez temprana producen más ácido acético, el cual posee actividad antimicótica. Por lo tanto, probablemente la alta concentración de ácido acético observada en los ensilajes con 25% MS explique la mayor estabilidad aeróbica de los mismos. Por su parte, los altos niveles de ácido acético podrían explicarse por la presencia de clostridios, hongos y enterobacterias, las cuales durante la fase inicial del proceso fermentativo generan grandes cantidades de ácido acético (Wilkinson y Davies, 2012).

Los ensilajes confeccionados con 25% MS, además de la alta concentración de ácido acético, tuvieron mayor contenido de agua, la cual actuaría a manera de barrera impidiendo el flujo de aire hacia el interior de la masa ensilada. Como consecuencia, sería menor el deterioro aeróbico debido a la menor concentración de oxígeno dentro del ensilaje (Wilkinson y Davies, 2012).

Según Contreras y Muck (2006), el contenido de etanol y ácido acético en ensilajes inoculados se atribuye a que durante la fermentación predominó la actividad de bacterias heterofermentativas. En los ensilajes con aditivos, al poseer un pH más elevado, este tipo de bacterias resultan menos inhibidas que en los ensilajes sin aditivos los cuales tienen un pH más ácido. En este trabajo no se observaron estas diferencias ya que los pH fueron similares en ambos tratamientos.

Nkosi *et al.* (2011) citó en su trabajo a Danner *et al.* (2003) quien observó que existe una relación directamente proporcional entre el ácido acético y la estabilidad aeróbica, y propuso que el aumento de la concentración de ácido acético inhibe el deterioro por los microorganismos, promoviendo la estabilidad aeróbica.

Al igual que el ácido acético, el ácido láctico fue diferente según el estado de madurez del cultivo, observándose la mayor concentración del mismo en los ensilajes con 25% MS. Ensilajes que han tenido una buena fermentación se caracterizan por tener predominancia de ácido láctico, ya que reduce el pH de la masa ensilada más rápidamente que otros ácidos (Mc Donald *et al.*, 2002).

Antes de la ruptura de la estabilidad aeróbica no se detectó en los ensilajes ácido butírico. No obstante, luego de la ruptura de la estabilidad aeróbica, sí se detectó ácido butírico aunque las diferencias no fueron significativas. Probablemente, la ausencia inicial de ácido butírico se deba al bajo pH alcanzado por los ensilajes. Sin embargo, una vez ocurrida la pérdida de estabilidad aeróbica, el pH asciende por encima de 4,2 lo que permite el desarrollo de microbios como clostridios que fermentan los CSA generando ácido butírico.

El pH permaneció casi constante en ambos tratamientos inoculados y en los diferentes estados de madurez antes de la ruptura de la estabilidad aeróbica y del consecuente aumento de la temperatura. En este trabajo, dicho valor permaneció por debajo de 4,2, el cual según Kung y Shaver (2001) es beneficioso para la correcta conservación de la planta entera de maíz como ensilaje.

Una vez ocurrida la ruptura de la estabilidad aeróbica, el pH aumentó ampliamente en los tratamientos inoculados y en los tres estados de madurez. Los ensilajes con 25 y 35% MS alcanzaron mayor pH con respecto a los ensilajes con 45% MS. El pH es un indicador del deterioro aeróbico del ensilaje, debido a que el ácido láctico es consumido por las levaduras y hongos durante la fase de exposición al oxígeno, permitiendo en consecuencia el incremento del mismo (Carvalho Basso, 2012). El mayor pH observado en los ensilajes con 25 y 35% MS probablemente se explique por la mayor concentración de CSA en los mismos, lo que permitiría la multiplicación de levaduras y hongos con la consecuente reducción de los niveles de ácido láctico.

Los ensilajes con 25% MS tardaron mayor cantidad de horas hasta romper la estabilidad aeróbica y alcanzar la temperatura máxima. De acuerdo a McDonald *et al.* (1991), el aumento de la temperatura del ensilaje es generado por la actividad metabólica de los microorganismos, debido a la oxidación microbiana de ácidos orgánicos y CSA a dióxido de carbono y agua. El mayor tiempo hasta romper la estabilidad aeróbica y alcanzar la temperatura máxima de los ensilajes con 25% MS probablemente se asocia con el mayor contenido de agua de los mismos. El aumento de la temperatura es mayor en los tratamientos con menor materia seca que en los de mayor materia seca, porque se requiere más calor para elevar la temperatura del material más húmedo (Wilkinson y Davies, 2012).

Las pérdidas de materia seca fueron mayores en los ensilajes con 45% MS con respecto a los ensilajes con 25 y 35% MS. Esta mayor pérdida de materia seca estaría asociada al consumo indeseable de nutrientes durante el período de conservación del material ensilado previo a la apertura del mismo. Probablemente esto se explique por el mayor pH final alcanzado en estos ensilajes que permiten que ciertas especies bacterianas no deseables permanezcan metabólicamente activas.

CONCLUSION

El uso de inoculante microbiano multicepa con *Lactobacillus buchneri* no mejoró la estabilidad aeróbica del ensilaje de maíz planta entera. Sin embargo, el estado de madurez al momento de la cosecha afectó la estabilidad aeróbica del ensilaje de maíz. A medida que se retrasó la cosecha, la estabilidad aeróbica del ensilaje empeoró, evidenciándose a través de una disminución de la cantidad de horas necesarias para superar la temperatura ambiente en 2° C. A su vez, esto se reflejó en una mayor pérdida de materia seca de estos ensilajes. En función de los resultados obtenidos, sería necesario seguir investigando para dilucidar cómo la población de microorganismos epífitos, concentración del inoculante microbiano y cepas bacterianas específicas afectan la estabilidad aeróbica del ensilaje de maíz.

En conclusión, la aplicación del inoculante en silajes cosechados con 25% MS mejora la estabilidad aeróbica del silo, debido a su alta concentración de ácido láctico, alto ácido acético, el cual posee acción antimicótica, y su bajo pH y N-amoniaco.

ANEXO I

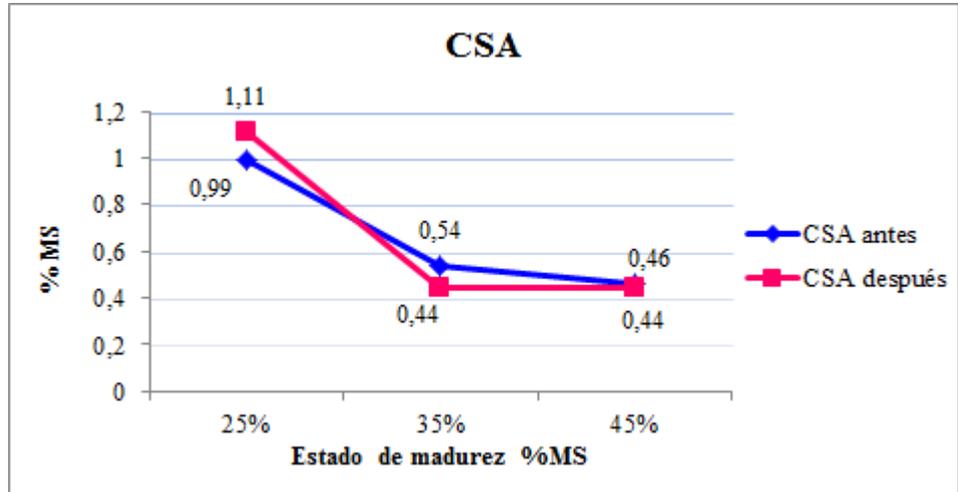


Figura N° 1. Concentración de CSA en los tres estados de madurez.

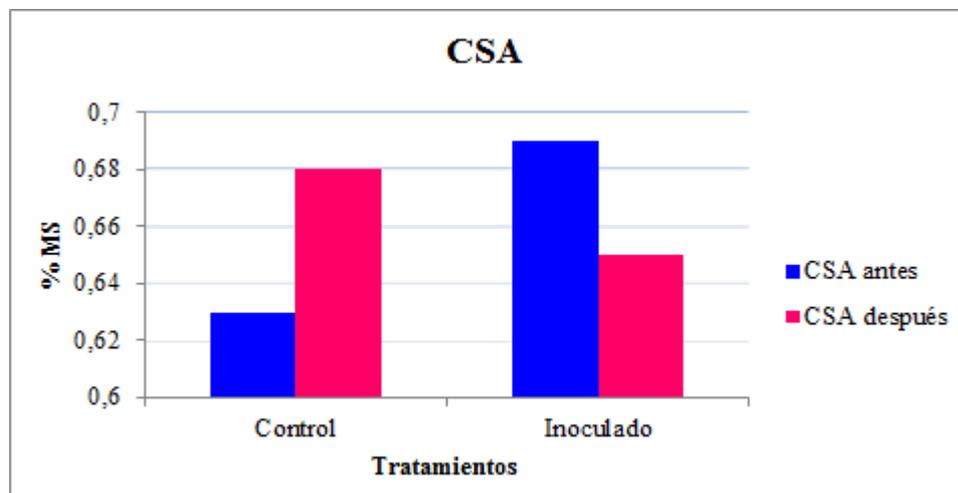


Figura N° 2. Concentración de CSA en los tratamientos inoculados.

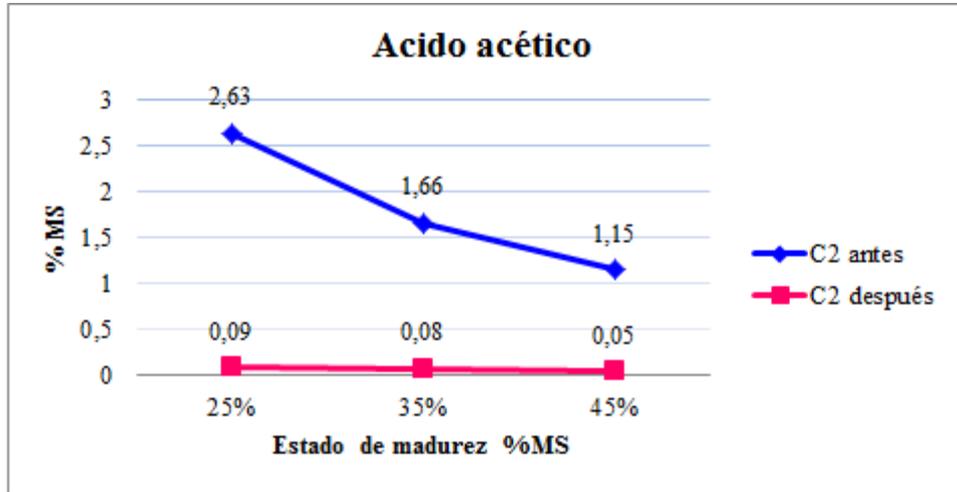


Figura N° 3. Concentración de ácido acético en los tres estados de madurez.

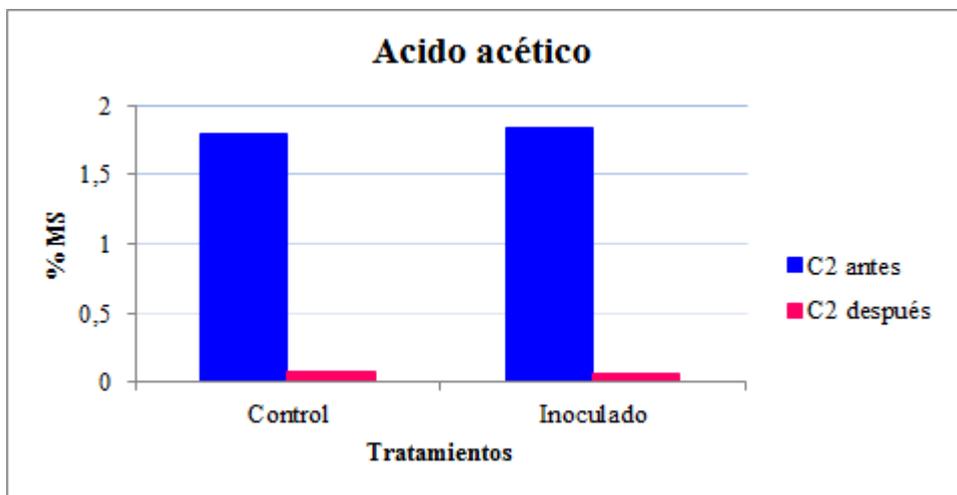


Figura N°4. Concentración de ácido acético en los tratamientos inoculados.

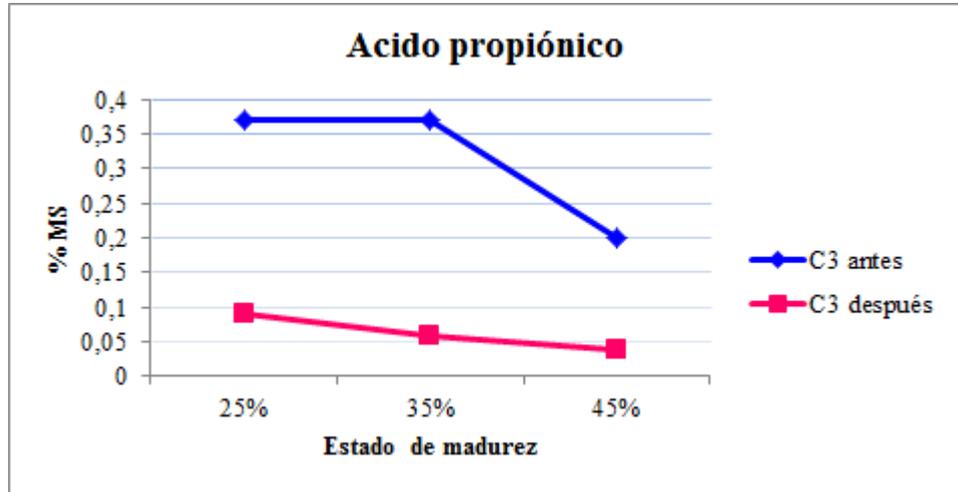


Figura N° 5. Concentración de ácido propiónico en los tres estados de madurez.

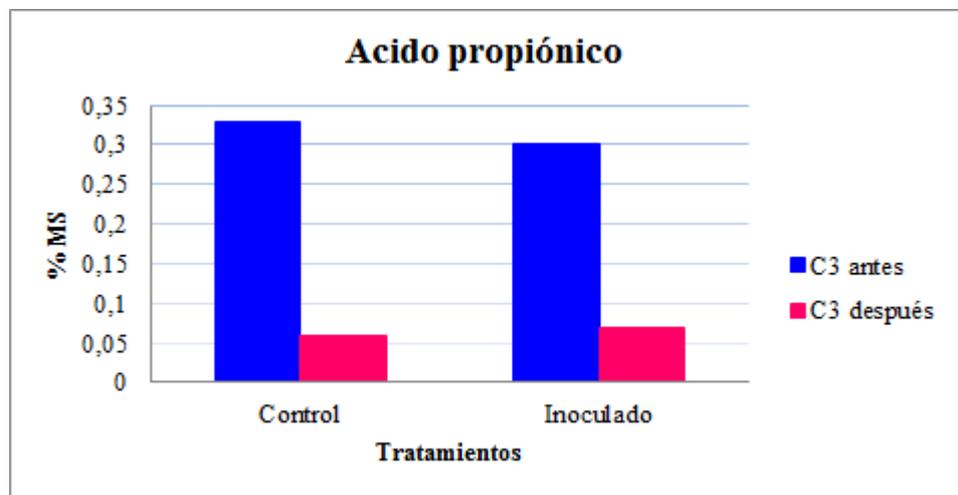


Figura N°6. Concentración de ácido propiónico en los tratamientos inoculados.

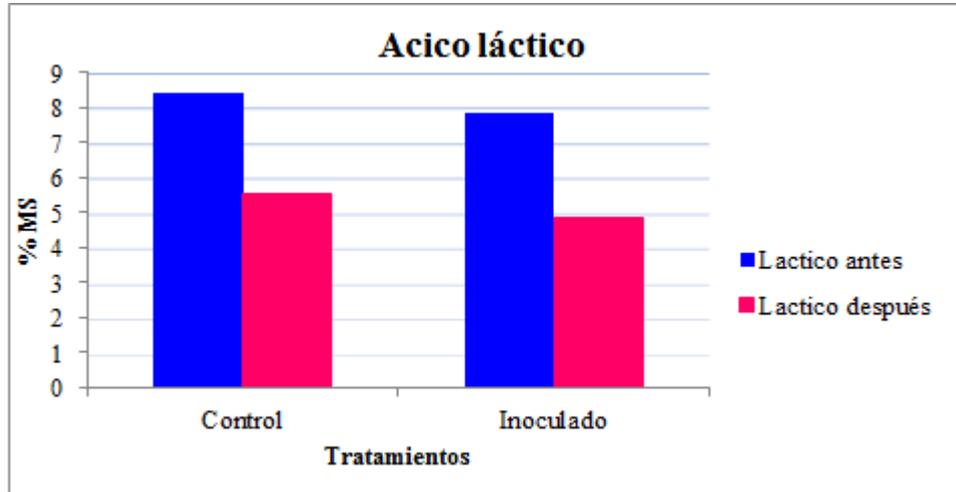


Figura N° 7. Concentración de ácido láctico en los tratamientos inoculados.

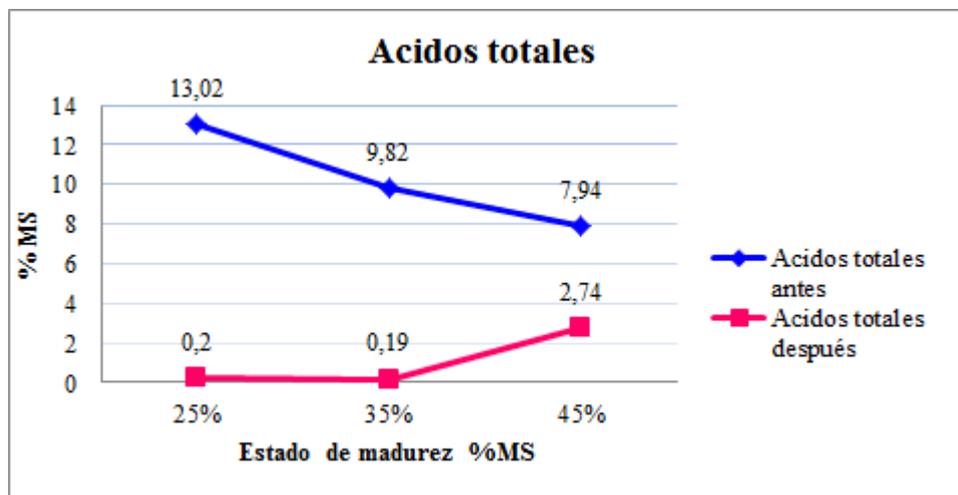


Figura N° 8. Concentración de ácidos totales en los tres estados de madurez.

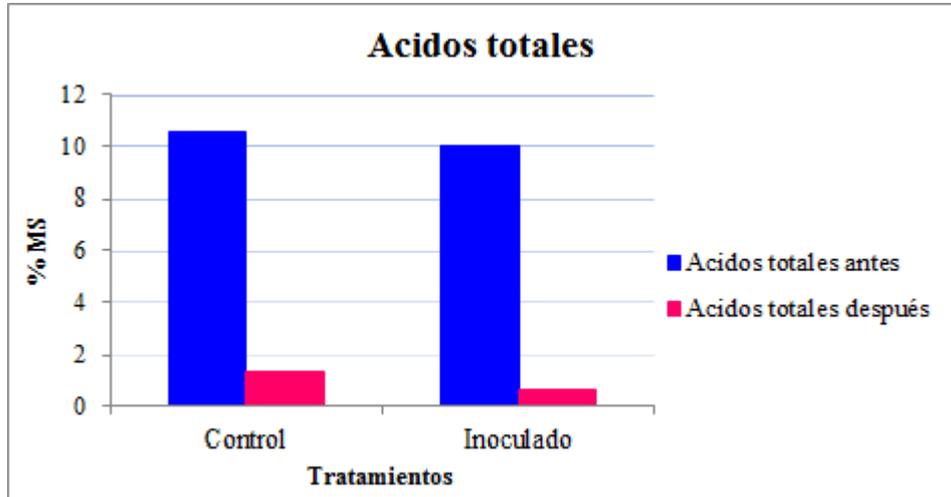


Figura N° 9. Concentración de ácidos totales en los tratamientos inoculados.

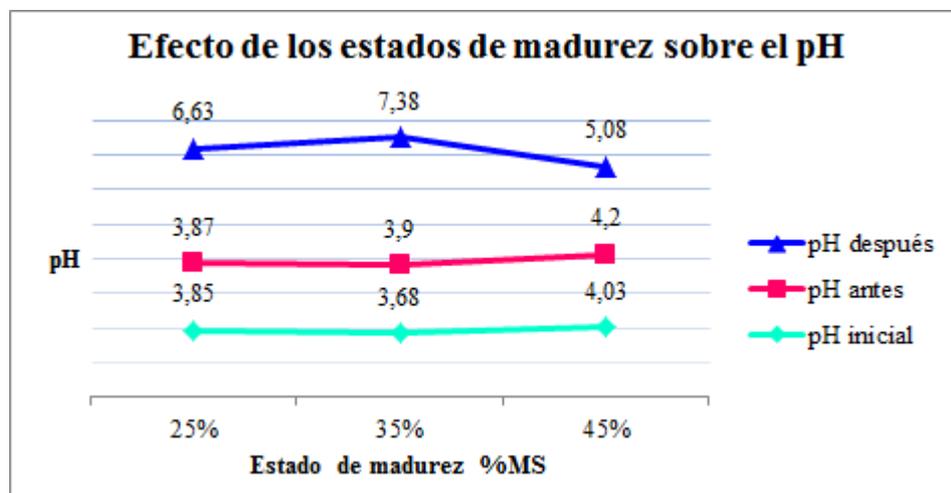


Figura N° 10. Efecto de los estados de madurez sobre el pH.

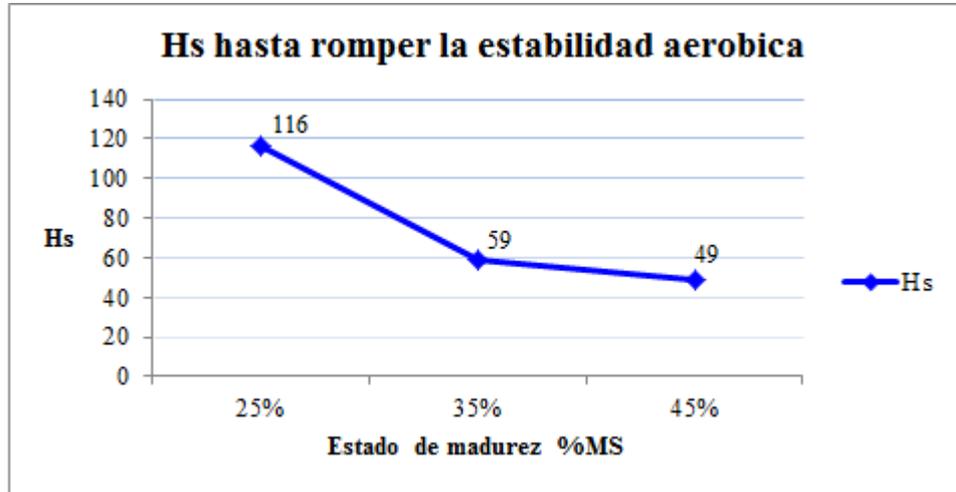


Figura N° 11. Cantidad de horas transcurridas hasta la ruptura de la estabilidad aeróbica en los tres estados de madurez.

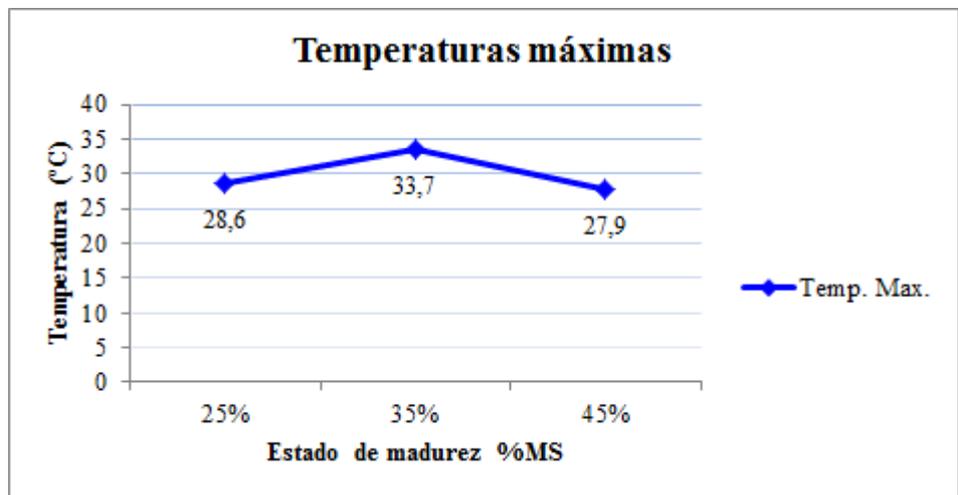


Figura N° 12. Temperaturas máximas alcanzadas en los tres estados de madurez.

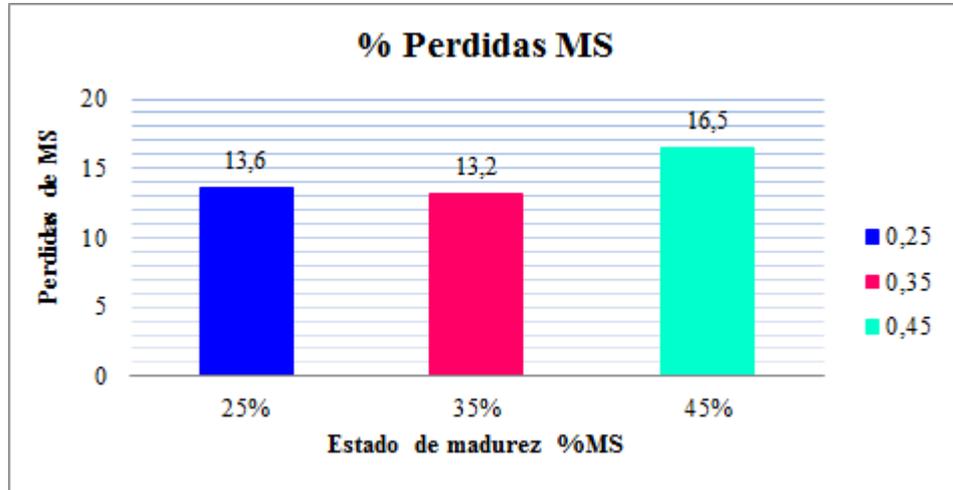


Figura N° 13. Porcentaje de pérdidas de materia seca en los tres estados de madurez.

ANEXO II

Confección de los silos



Figura N°14. Cosechadora experimental de parcelas (Cibus F. de Wintersteiger).



Figura N° 15. Receptáculo con cinta transportadora y balanza de la cosechadora.



Figura N° 16. Pesaje del inoculante.

Apertura 1° Silos, 25% MS



Figura N° 17. Preparación del material en los micro-silos



Figura N° 89. Pesaje del material ensilado en bandejas de plástico para calcular la estabilidad aeróbica.



Figura N° 19. Las 6 bandejas (3 control y 3 inoculadas) con el material ensilado preparadas para la determinación de la estabilidad aeróbica



Figura N° 20. Medición de la temperatura en el centro de la masa ensilada mediante un termómetro Digital Thermo.

Apertura 2° Silos, 35% MS



Figura N° 21. Bandejas correspondientes a la segunda apertura de silos (35% MS). Preparadas para la determinación de la estabilidad aeróbica.

Apertura 3° Silos, 45% MS



Figura N° 22. Bandeja correspondiente a tercera apertura de silos (45% MS). Tratamiento control II.

Medición de pH



Figura N° 23. Envases de plástico con 10 gr. de muestra en 100 ml. de agua destilada, donde se realizó la medición de pH.



Figura N° 24. Peachimetro portátil Agar 2000.

BIBLIOGRAFIA:

- ACOSTA ARAGON, Y., JATKAUSKAS, J., VROTNIAKIENE, V., 2012. *The effect of a silage inoculant on silage quality, aerobic stability and meat production on farm scale*. International scholarly Research Network, ISRN, Veterinary Science.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS (AACC), 1995. *Approved Methods of Analysis*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- ANDRADE REIS, R., CARVALHO BASSO, F., DE TOLEDO PIZA ROTH, A. P., FERNANDES BERNARDES, T., RUGGIERI, A. C., SILVEIRA RABELO, C. H., 2012. *Fermentation and aerobic stability of high-moisture corn silages inoculated with different levels of Lactobacillus buchneri*. Revista Brasileira Zootecnia, Vol.41, N°11, pág. 2369-2373.
- BAL, M.A.; COORS, J.G.; SHAVER, R.D., 1997. *Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion, and milk production*. J. Dairy Sci., 80, pág. 2497-2503.
- CATTANI, P.; BRAGACHINI, M.; PEIRETTI, J., 2008. *En Forrajes conservados de alta calidad y aspectos relacionados al manejo nutricional*. Pág. 135-175.
- CONTRERAS-GOVEA, F. E., MUCK, R. E., 2006. *Microbial inoculants for silage*. Focus on Forage, 8(4).
- CONTRERAS-GOVEA, FRANCISCO E., MARSALIS, MARK A., LAURLAULT, LEONARD M., 2009. *Silage microbial inoculants: Use in hot weather conditions*. NM State University. Cooperative Extension Service. College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences. Circular 642.
- COUDERC, J.J., SANTINI, F.J., Y DEPETRIS, G.J. 2004. *Digestión y caracterización del ambiente ruminal de dietas a base de silajes de maíz o sorgo*. Revista de Argentina de Producción Animal Vol. 24, Supl. Pp. 53-54.
- DANNER, H., HOLZER, M., MAYRHUBER, E., & BRAUN, R., 2003. *The role of Lactobacillus buchneri in forage preservation*. Trends Biotechnol. 21 (6), pag. 282-287.
- DAVIEST, D. R., WILKINSON, J. M., 2012. *The aerobic stability of silages: key findings and recent developments* Blackwell Publishing Ltd. Grass and Forage Sciences, 68, pag. 1-19.
- DI RIENZO J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M. & ROBLEDO, C.W. InfoStat version 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- DRIEHUIS, F., OUDE-ELFERINK, S. J. W. H. AND VAN-WIKSELAAR P. G., 2001. *Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with Lactobacillus buchneri, with or without homofermentative lactic acid bacteria*. Blackwell Science Ltd. Grass and Forage Science, 56, pag. 330-343.
- ELIZALDE, J. C., SANTINI, F. J., 1993. *Utilización de los granos en la alimentación* Rev. Arg. Prod. Animal. 13: 39-60.
- ELIZALDE, J.C. 1990. *Suplementación con silo de maíz en vacunos en pastoreo de avena, ambiente ruminal y dinámica de la digestión*. Tesis M. Sc. Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. Balcarce. Pág. 110.

- FERNÁNDEZ MAYER ,A.E., 1999. *Silaje de planta entera de maíz, sorgo, pasturas y cereales de invierno*. Material didáctico N° 5 ISSN 0326-2626. Pp. 50.
- FERNÁNDEZ-LORENZO, B., BARREAL, M.L., FLORES, G., GONZÁLEZ-ARRÁEZ, A., VALLADARES, J., PEREIRA, S. Y CARDELLE, M., 2007. *Estabilidad aeróbica y calidad fermentativa e higiénica de ensilados de maíz. Efecto de la fecha de aprovechamiento y del uso de inoculantes*. Pastos, XXXVII, pág. 71-80.
- FILLYA, 2003. *The effect of Lactobacillus buchneri, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silage*. Journal of Applied Microbiology, 95. Faculty of Agriculture, Uludag University, Bursa, Turkey. Pág. 1080-1086.
- 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*. J. Dairy Sci. 86:3575–3581
- FISHER Y BURNS, 1987. *Quality analysis of summer-annual forages I. Sample preparation and chemical characterization of forage types and cultivars*. Agron. J. 79:236-242.
- FRIGGENS, N.C., OLDHAM, J.D., DEWHURST, R.J., HORGAN, G., 1998. *Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage*. J. Dairy Sci. 1998;81:1331–1344.
- GALLARDO M., 2013. *Valor nutritivo de los cultivos de maíz y sorgo para ensilar bajo estrés (climático e hídrico)*.
- GOERING, H. K. AND VAN SOEST, P.J., 1970. *ForageFiber Analysis (apparatus, eagents, prosedures and some applications)*. USDA Agricultural Handbook N° 379.
- GUAITA M.S. Y H.H. FERNÁNDEZ, 2005. *Tabla de Composición Química de Alimentos para Rumiantes. Área de Investigación en Producción Animal, INTA EEA Balcarce, CERBAS, Buenos Aires, Argentina*.
- JAURENA, G., 2008. *Contribución de la inoculación bacteriana a la fermentación de silajes de planta entera de maíz y sorgo*. Revista Argentina de Producción Animal, Vol. 28, Supl. 1, pag. 21-28.
- JIMENEZ, P., CORTES, H., ORTIZ, S. 2005. *Rendimiento forrajero y calidad del ensilaje de canavalia en monocultivo y asociada con maíz*. Acta Agronómica 54(2). Universidad Nacional de Colombia ISSN: 0120-2812 Colombia. Consultado el 16/10/07 en: http://www.revista.unal.edu.co/index.php/acta_agronomic/article/view/110/240.
- JOBIM, C.C., NUSSIO, L., RIES, R, Y SCHMIDT, P. 2007. *Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem canservada*. Revista brasileira de zootecnia, Vol. 36, suplemento especial, pag. 101-119.
- JOHNSON, L., HARRISON, J. H., DAVIDSON, D., MAHANNA, W. C., SHINNERS, K., LINDER, D., 2001. *Com silage management: effect of maturity, inoculation, and mechanical processing on pack density and aerobic stability*. J. Dairy Sci. 85, 434-444.
- JOHNSON, L., HARRISON, J. H., HUNT, C., SHINNERS, K., DOGGETT, C. G., SAPIENZA, D., 1999. *Nutritive value of com silage as affected by maturity and mechanical processing: a contemporary review*. J. Dairy Sci. 82, 2813-2825.

- KILKENNY, J.B., 1978. Utilization of maize for beef production. In: Bunting, E.S., Pain, B.T., Phipps, R.H. Wilkinson, J.M. y Gunn, R.E. (eds) Forage maize production and utilization. Agr. Res. Cou. London. Pag. 201-238.
- KUNG JR., L. & SHAVER, R., 2001. *Interpretation and use of silage fermentation analysis reports*. University of Wisconsin, Madison, WI, USA. Focus on Forage 3 (13), 1-5.
- KUNG JR., L., SCHMIDT, R.J., TELLER, R.S., WHITHOW, L.W., 2012. *Effect of physical damage to ears of corn before harvested and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation and aerobic stability of corn silage*. Journal of Dairy Science, Vol. 95, N°3, pag. 1428-1436.
- KUNG, JR., PH.D., 2000-2001. *Silage fermentation and additives*. Professor, Department of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Newark, DE. Direct-fed Microbial Enzyme & Forage Additive Compendium, Miller Publishing Co., Minnetonka, MN.
- KUNG, L. JR, STOKES, M.R. AND LI, N.C.J., 2003. *Silage additives*. In: Buxton D.R., Muck R.E. and Harrison J.H. (eds) *Silage science and technology*, pp. 305–360. Madison, WI, USA: Agronomy Publication N° 42, American Society of Agronomy.
- MC DONALD, P., HENDERSON A.R. AND HERON S.J.E., 1991. *The biochemistry of silage*, 2nd edn. Marlow, UK: Chalcombe Publications.
- MCDONALD, P., EDWARDS, R.A., GREEMHALGH, J. F. D. & MORGAN, C. A., 2002. *Animal Nutrition*. 6th ed. Longman Scientific and Technical, Prentice Hall, New Jersey, USA.
- MUCK, R. E., AND KUNG, JR L., 1997. *Effect of silage additives on ensiling. Proceedings of the conference on Silage: Field to feedbunk*. North American Conference Hershey, PA. NRAES-99.
- NKOSI, B.D., MEESKE, R., LANGA, T., AND THOMAS R.S., 2011. *Effects of bacterial silage inoculants on whole-crop maize silage fermentation and silage digestibility in rams*. South African Journal of Animal Science, 41 (N° 4), pag. 350-359.
- OHYMA, Y., HARA, S.H. AND MASAKI, S.H., 1980. *Analysis of the factors affecting aerobic deterioration of grass silages*. Proceedings on Forage Conservation in the 80's. Occasional Symposium No. 11 British Grassland Society. Pag. 257-263.
- OJEDA, F., CACERES, O., ESPERANCE, M. 1991. *Conservación de Forrajes*. Editorial Pueblo y Educación. Pag. 80.
- OPACAK F., 2013. *Silos de calidad*. 4ta Jornada Nacional de Forrajes Conservados.
- PAHLOW, G., MUCK, R.E., DRIEH, U.I.S.F., OUDE ELFERINK S.J.W.H. AND SPOELSTRA S.F., 2003. *Microbiology of ensiling*. In: Buxton D.R., Muck R.E. and Harrison J.H. (eds) *Silage science and technology*, pp. 31–93. Madison, WI, USA: Agronomy Publication No. 42, American Society of Agronomy.
- RANJIT, N.K. AND KUNG L. JR. 2000. The Effect of *Lactobacillus buchneri* *Lactobacillus plantarum*, or a Chemical Preservative on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage. J. Dairy Sci. 83:526–535.
- RITCHIE, R.J., 1982. *Sulphate transport in the cyanobacterium Synechococcus R-2 (Anacystis nidulans, S. leopoliensis)* PCC 7942. Plant Cell Environ.

- RUSSELL, J. R., IRLBECK, N. A., HALLAUER, A. R., BUXTON, D. R., 1992. *Nutritive value and ensiling characteristics of maize herbage as influenced by agronomic factors*. Animal Feed Sci. Technol. 38, Pag. 11-24.
- SANTINI, F. 2012. *Nutrición y usos de los forrajes conservados en la producción de carne y leche*. En 3° jornada nacional de forrajes conservados. 28-29 de marzo del 2012 INTA Manfredi. 59-67.
- SCHENEITER Y CARRETE, 2004. *Aspectos Agronómicos del Maíz para Silaje*. Revista IDIA XXI: Cereales. Pag 134-140.
- TABACCO, E., S. PIANO, A. REVELLO-CHION Y G. BORREANI., 2011b. *Effect of Lactobacillus buchneri Ln4637 and Lactobacillus buchneri Ln40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions*. J. Dairy Sci. 94 :5589–5598.
- TABACCO, E., F. RIGHI, A. QUARANTELLI, AND G. BORREANI., 2011a. *Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inoculant*. J. Dairy Sci. 94:1409–1419.
- TAYLOR, C.C. Y KUNG JR., L., 2002. *The effect of Lactobacillus buchneri 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos*. Journal of Dairy Science, Vol. 85, pag. 1526-1532.
- TELLER, R. S., SCHMIDT R. J., WHITLOW L. W. AND KUNG JR, L., 2012. *Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobics stability of corn silage*. Journal of Dairy Science Vol. 95 N° 3, pag. 1428-1437.
- VIEIRA DA CUNHA M. 2009. *Conservacao de forragem*. Pesquisador da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuaria (IPA) e Doutorando do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da UFRP, pag.1-26.
- WILKINSON, J. M., 2005. In: *Silage. Part 6: Assessing silage quality*. Chapter 19: *Analysis and clinical assessment of silage*. Ed. Wilkinson, J. M., Chalcombe Publications, UK. Pag. 198-208.
- WILKINSON, J. M.; GONZALEZ SANTILLANA, R., 1978. *Ensiled alkali-treated straw. I. effect of level and type of alkali on the composition and digestibility in vitro of ensiled barley straw*. Anim. Feed Sci. Technol., Vol. 3, pag. 117-132.
- WILKINSON, J.M., 1999. *Silage and animal health*. Natural Toxins, 7, 212–230.
- WOOLFORD, M.K. (1990). *The detrimental effects of air on silage*. J. Appl. Bacteriol. 68: 101-116.
- XU, S.; HARRISON, J.H.; KEZAR, W.; ENTRIKIN, N.; LONEY, K. A.; RILEY, R.E., 1995. *Evaluation of yield, quality, and plant composition of early-maturing corn hybrids harvested at three stages of maturity*. Prof. Anim. Sci., 11, 157-165.
- ZIMMER, E., 1980. *Efficient silage systems*. In: C. Thomas (ed). Occasional Symposium of the British Grassland Society N° 11, Brighton, UK. pp. 186-197.