

**Evaluación de dos inóculos microbianos como activadores de la fermentación en ensilajes de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray****Evaluation of two microbial inoculants as fermentation activators in silages of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**

Marlen Rodríguez-Oliva<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4248-3728>, Félix Ojeda-García<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6770-4227>, Yaimara Pozo-Pérez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8517-1551>, Ana Julia Rondón-Castillo<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3019-1971>, Grethel Milián-Florida<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6074-7464>

<sup>1</sup>Universidad de Matanzas. Autopista Varadero km 3 ½, Matanzas, Cuba. <sup>2</sup>Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey. Universidad de Matanzas, Ministerio de Educación Superior. Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba. Correo electrónico: rodriguezoliva75@gmail.com, fojeda@ihatuey.cu, yaimarapo@gmail.com, ana.rondon@umcc.cu, grethelmilian@umcc.cu

**Resumen**

**Objetivo:** Evaluar el efecto de dos inóculos microbianos como activadores de la fermentación en ensilajes de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.

**Materiales y Métodos:** El forraje de *T. diversifolia*, con 90 días de rebrote, se obtuvo de una parcela fertilizada con 20 t de materia orgánica/ha. La colecta fue manual y las plantas se procesaron en una troceadora estacionaria (1-2 cm). Se sometieron a presecado, bajo techo, durante 24 horas. Los tratamientos fueron: a) *T. diversifolia* sin inóculo, b) *T. diversifolia* con suero de leche y c) *T. diversifolia* con PROBIOLACTIL®. Las evaluaciones se efectuaron a los 15, 30, 45 y 60 días de conservación. Los inóculos tuvieron una concentración de bacterias lácticas, UFC mL<sup>-1</sup>, de 10<sup>6</sup> para el suero de leche y de 10<sup>9</sup> para el PROBIOLACTIL®. Se evaluaron los indicadores materia seca, pH, proteína soluble, conteo de bacterias ácido lácticas e indicadores organolépticos (olor, color, textura y humedad). Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza simple y la diferencia entre medias según Duncan, con el programa *Statgraphic Plus*, versión 5.0.

**Resultados:** El porcentaje promedio de materia seca se adecuó para la conservación (35,2 %) y mostró tendencia a aumentar, según transcurrió el tiempo de muestreo, al igual que la proteína soluble (0,77 mg mL<sup>-1</sup>) como promedio. Los conteos de microorganismos viables demostraron que la inclusión de los aditivos biológicos facilitó el predominio de bacterias lácticas. Durante la conservación, los valores de pH tendieron a disminuir entre los tratamientos, aunque sin respuestas.

**Conclusiones:** Los resultados de pH, materia seca, proteína, conteo de bacterias ácido lácticas y características organolépticas demostraron que los inóculos microbianos activan el proceso de fermentación en los ensilajes de *T. diversifolia*. El PROBIOLACTIL® fue superior al suero de leche.

**Palabras clave:** aditivos de ensilaje, alimentación de rumiantes, bacterias

**Abstract**

**Objective:** To evaluate the effect of two microbial inoculants as fermentation activators in silages of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.

**Materials and Methods:** *T. diversifolia* forage, with 90 days of regrowth, was obtained from a plot fertilized with 20 t of organic matter/ha. Collection was manual and the plants were processed in a stationary chopper (1-2 cm). They were subject to pre-drying, under roof, for 24 hours. The treatments were: a) *T. diversifolia* without inoculant, b) *T. diversifolia* with whey and c) *T. diversifolia* with PROBIOLACTIL®. The evaluations were carried out after 15, 30, 45 and 60 days of storage. The inoculants had a concentration of lactic bacteria, CFU mL<sup>-1</sup>, of 10<sup>6</sup> for the whey and 10<sup>9</sup> for PROBIOLACTIL®. The indicators dry matter, pH, soluble protein, lactic acid bacteria count and organoleptic indicators (smell, color, texture and moisture) were evaluated. The data were processed using a simple variance analysis and the difference among means according to Duncan, with the program *Statgraphic Plus*, version 5.0.

**Results:** The average dry matter percentage was adequate for conservation (35,2 %) and showed a trend to increase, as the sampling time elapsed, just like soluble protein (0,77 mg mL<sup>-1</sup>) on average. The counts of viable microorganisms showed that the inclusion of biological additives facilitated the predominance of lactic acid bacteria. During storage, pH values tended to decrease among treatments, although without responses.

**Conclusions:** The results of pH, dry matter, protein, lactic acid bacteria count and organoleptic characteristics proved that microbial inoculants activate the fermentation process in *T. diversifolia* silages. PROBIOLACTIL® was better than whey.

**Keywords:** silage additives, ruminant feeding, bacteria

Recibido: 04/03/2022

Aceptado: 07/07/2022

Como citar este artículo: Rodríguez-Oliva, Marlen; Ojeda-García, Félix; Pozo-Pérez, Yaimara; Rondón-Castillo, Ana Julia & Milián-Florida, Grethel. Evaluation of two microbial inoculants as fermentation activators in silages of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. *Pastos y Forrajes*. 45:eE22, 2022

Este es un artículo de acceso abierto distribuido en Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> El uso, distribución o reproducción está permitido citando la fuente original y autores.

## Introducción

Impulsar el desarrollo de la ciencia hacia nuevos enfoques de producción, que garanticen mayor eficiencia para enfrentar los crecientes problemas de seguridad alimentaria, ha favorecido la búsqueda de alternativas sostenibles para ofrecer alimento animal a menor costo y mayor productividad. En Cuba, por las limitaciones que presentan los bovinos con la disponibilidad de forraje en la época poco lluviosa, constituye una necesidad primordial diversificar la oferta forrajera, en cantidad y calidad, en los sistemas ganaderos (Ontiveros Vasallo, 2021).

En los últimos años, la inclusión de proteicas forrajeras, como *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, en dietas bovinas ha permitido reducir los costos de producción y la incidencia de enfermedades metabólicas; además de incrementar el desempeño productivo y reproductivo de los animales. El uso de esta planta como recurso para la alimentación animal es cada vez más frecuente, debido a su buen valor nutricional, rusticidad y elevada tasa de producción de biomasa (Galindo-Blanco *et al.*, 2018).

Existen experiencias con la utilización de *T. diversifolia* en sistemas de alimentación, incluso en silvopastoriles (Galindo-Blanco *et al.*, 2018). No obstante, su conservación en forma de ensilaje ha sido menos estudiada, a pesar de que este procedimiento, además de asegurar su disponibilidad durante todo el año, permite retener mucho mejor que la henificación las cualidades nutritivas del pasto original (Rodríguez *et al.*, 2019). Actualmente, los inoculantes con bacterias ácido lácticas (BAL) se convierten en el tipo más frecuente de aditivo para ensilar (Tingo-Jácome, 2020).

En condiciones normales, las fermentaciones que promueven la conservación se desarrollan a partir de las bacterias nativas presentes en las plantas. Ellas son altamente variables porque dependen no solo del forraje, sino de las condiciones ambientales (Ojeda-García *et al.*, 2020). Por ello es que se promueve la introducción de aditivos biológicos basados en BAL, para conferir una ventaja numérica a estos microorganismos. De este modo, mediante la rápida reducción del pH, se garantiza la inhibición de otros microorganismos que deterioran el material conservado y, sobre todo, se favorece la preservación de los carbohidratos y proteínas originales presentes en los forrajes (Castro-Rincón *et al.*, 2020).

Desde esta perspectiva, la Universidad de Matanzas ha implementado la utilización de dos

inóculos microbianos para mejorar la calidad fermentativa y nutricional de los ensilajes: un probiótico basado en bacterias lácticas, que induce beneficios en los indicadores productivos, morfométricos, inmunológicos y de salud, de diferentes especies y categoría animal, que es el PROBIOLACTIL® (Rondón-Castillo *et al.*, 2018, 2020), y el suero de la leche, subproducto de la industria quesera, en cuya composición existen altas concentraciones de BAL, lo que deja ver sus potencialidades para ser utilizado como inóculo biológico en la conservación de forrajes.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de estos inóculos microbianos como activadores de la fermentación en ensilajes de *T. diversifolia*.

## Materiales y Métodos

**Localización.** Las investigaciones se desarrollaron en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas (UM) y la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey (EEP-FIH). Se trabajó con dos inóculos microbianos (suero de leche y PROBIOLACTIL®) como activadores de la fermentación en ensilajes de *T. diversifolia*.

**Origen y composición de los inóculos microbianos.** El suero de leche procedió de la fábrica quesera, perteneciente a la Empresa Provincial de Productos Lácteos, en Matanzas, Cuba. Se trata de un subproducto de la industria láctea, que posee en su composición una concentración de BAL de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. El PROBIOLACTIL® provino del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la UM. Este es un biopreparado probiótico, basado en *Lactobacillus salivarius*, cepa C65, con una concentración de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, aislado previamente de la mucosa del ciego de pollos de ceba e identificado por técnicas de biología molecular. El aditivo se elaboró según la metodología propuesta por Rondón-Castillo (2009).

**Selección y tratamiento del material vegetal utilizado para el ensilaje.** El forraje de *T. diversifolia* se obtuvo de una parcela con cuatro años de establecida. El área recibió un corte de homogenización y una fertilización orgánica equivalente a 20 t ha<sup>-1</sup>. La edad de rebrote fue de 90 días y las plantas no estaban florecidas. La colecta se realizó de forma manual y la planta se procesó en una troceadora estacionaria (1-2 cm). El material se esparció en una manta plástica y se sometió a un tratamiento de secado, bajo techo, durante 24 h.

**Procedimiento experimental.** Los ensilajes se confeccionaron en bolsas de polietileno, de cuatro

micras de espesor, con 12 cm de ancho por 24 cm de largo, a razón de ocho bolsas por tratamiento, para un total de 24 bolsas. El material (400 g por bolsa) se introdujo y compactó de forma manual, con la cautela de no perforar las bolsas. En los tratamientos con inóculo, se colocaron en una bandeja los 3 200 g de forraje correspondientes. Se incorporaron de forma manual y homogénea 10 mL del inóculo por cada 100 g de material vegetal. Al finalizar el llenado, las bolsas se sellaron herméticamente, enrollando cinta adhesiva sobre el polietileno. Para reforzar las condiciones de anaerobiosis, se introdujeron en otra bolsa, que también se embobinó con cinta adhesiva. Cada bolsa constituyó una unidad experimental. La conservación se desarrolló en condiciones ambientales, en un estante protegido de la luz solar. Los tiempos de apertura se fijaron a los 15, 30, 45 y 60 días. Se establecieron dos bolsas abiertas por tratamiento cada día de muestreo, para evaluar los indicadores pH, proteína soluble (Lowry *et al.*, 1951) y materia seca (MS) (AOAC, 2010), conteo de BAL e indicadores organolépticos, (olor, color, textura y humedad) del material ensilado, según Ojeda (2018). Se aplicó un diseño completamente aleatorizado. La tabla 1 muestra los tratamientos evaluados.

**Procesamiento estadístico.** Los indicadores evaluados (pH, MS y proteína) se sometieron a un análisis de varianza simple, previa comprobación de la distribución normal de los datos y de la homogeneidad de varianza. Las diferencias entre medias se determinaron mediante la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan. Para este análisis se utilizó el programa *Statgraphic plus*, versión 5.0. Los conteos de microorganismos viables se transformaron según Log N, para garantizar las condiciones de la normalidad en la curva de crecimiento.

Para el análisis se aplicó la fórmula  $(K+N) \cdot 10^x$ , donde:

K - constante que representa el logaritmo de la dilución donde se inoculó el microorganismo

N - número de UFC

10 - base de los logaritmos

X - dilución a la que se efectuó la inoculación

### Resultados y Discusión

El contenido de MS del forraje es el indicador más importante que se debe considerar antes de iniciar el proceso de ensilaje. Su valor óptimo debe variar entre 30 y 35 %, para lograr una fermentación adecuada y minimizar las pérdidas del producto final. Según plantea Sánchez-Ledezma (2018), cuando los forrajes a ensilar no cumplan este requisito, se recomienda un presecado antes de confeccionarlos. En esta investigación, el forraje de *T. diversifolia* mostró valores iniciales de MS y proteína, similares a los que encontraron Londoño *et al.* (2019). Sin embargo, en la tabla 2 se muestra la modificación de estos valores por el efecto del presecado.

En el proceso de conservación, a partir de los 15 días, la MS mostró tendencia a aumentar en los tres ensilajes (tabla 3). Se presentó interacción significativa ( $p < 0,05$ ) entre el tiempo y los tratamientos. El control manifestó cifras inferiores con respecto a los tratamientos inoculados. De ellos, PROBIOLACTIL® mostró el mayor porcentaje. A pesar de haber diferencias entre los ensilajes que utilizaron aditivos microbianos, a los 60 días ambos mostraron valores superiores o iguales a 35 %. No obstante, la MS del ensilado sin inocular (control) resultó por debajo de este valor.

Se destaca aquí que el contenido final de MS en los ensilajes inoculados (suero de leche y PROBIOLACTIL®) no varió prácticamente con respecto

Tabla 1. Tratamientos evaluados.

Tratamiento	Material vegetal	Inóculo	Dosis mL/ 100 g de forraje
Control	<i>T. diversifolia</i> presecada	-	0
Suero de leche	<i>T. diversifolia</i> presecada	Suero de leche	10
PROBIOLACTIL®	<i>T. diversifolia</i> presecada	PROBIOLACTIL®	10

Tabla 2. Porcentajes de MS y proteína soluble de *T. diversifolia*.

Indicador	Unidad	Inicial	Presecada
MS	%	22,6	35,2
Proteína	%	12,7	11,9

Tabla 3. Interacción tiempo y tratamiento para la MS durante la conservación de los ensilajes.

Tratamiento	Materia seca, %			
	15 días	30 días	45 días	60 días
Control	33,3 <sup>b</sup>	34,0 <sup>g</sup>	34,2 <sup>fg</sup>	34,4 <sup>ef</sup>
Suero de leche	34,0 <sup>g</sup>	34,3 <sup>efg</sup>	34,7 <sup>cd</sup>	35,0 <sup>bc</sup>
PROBIOLACTIL®	33,0 <sup>b</sup>	34,6 <sup>de</sup>	35,1 <sup>b</sup>	35,5 <sup>a</sup>
EE ±	0,168	0,095	0,141	0,161
Valor - P	0,000			

a, b, c, d, e, f, g y h: Medias con letras distintas difieren según Duncan para  $p < 0,05$

al forraje fresco presecado (tabla 3). Hubo tendencia a que recuperara su valor inicial (35,2 %). Este comportamiento se relaciona con lo informado por Castro-Rincón *et al.* (2020), quienes plantean que la presencia de inóculos con BAL mejora la estabilidad de la MS en los ensilajes. Según estos autores, el uso de BAL reduce la pérdida de MS y así, se preserva la calidad de la planta ensilada lo más cerca posible de su estado original. Kung *et al.* (2018) alegan que el objetivo de hacer ensilaje es producir un alimento estable, con alta recuperación de MS, energía y nutrientes, altamente digeribles, similares al cultivo fresco.

En correspondencia con los resultados de este estudio, Castro-Rincón *et al.* (2020) obtuvieron mayor contenido de MS, al emplear BAL para mejorar la calidad de los ensilajes de *Zea mays* L. Por lo tanto, el uso de aditivos se considera una alternativa para optimizar el proceso de ensilaje y mantener el valor nutritivo de la planta, sin afectar los parámetros de fermentación (Muck *et al.*, 2018).

En la tabla 4 se muestra el contenido de proteína soluble, cuando se presentó interacción significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos y el tiempo de conservación. Se hallaron los mayores valores en los ensilajes, en los que se inocularon BAL. De ellos, el ensilado tratado con PROBIOLACTIL® no presentó diferencias entre los tiempos de 15 y 30 días, pero sí entre 45 y 60, siendo este último el de mayor valor (0,99 mg mL<sup>-1</sup>). Este resultado puede obedecer al efecto de las BAL en los ensilados.

Los resultados de este estudio están en correspondencia con los criterios de autores que plantean que el uso de lactobacilos acelera la tasa de fermentación inicial del ácido láctico, disminuye el pH y genera reducción en la degradación (proteólisis) y pérdida de proteína durante el proceso de conservación (Ertekin y Kızılışımşek, 2019). Los inoculantes bacterianos más comunes, encontrados en el mercado, están

conformados por BAL homofermentativas. Estas bacterias logran preservar la calidad de la planta ensilada, reducen las pérdidas de MS al mínimo, y disminuyen la desnaturalización de las proteínas (Tingo-Jácome, 2020).

Se comprobó que *L. salivarius* C-65, empleado para elaborar PROBIOLACTIL®, es una bacteria homofermentativa, capaz de utilizar carbohidratos presentes en la dieta (Rondón-Castillo *et al.*, 2020). Esta característica se puede relacionar con lo que sucedió en este experimento, pues se conoce que el forraje de *T. diversifolia* cuenta con importantes cantidades de proteína y carbohidratos solubles (Gallego-Castro *et al.*, 2017; Londoño *et al.*, 2019), por lo que una vez que se suministra este inóculo (PROBIOLACTIL®) al ensilaje, estos lactobacilos deben participar en la degradación de los azúcares presentes en la planta para producir, fundamentalmente, ácido láctico, y contribuir a evitar mayor pérdida de proteína. De ahí que los mayores valores de proteína, informados en la presente investigación, se corresponden con este tratamiento.

Gutiérrez *et al.* (2014) ensilaron *T. diversifolia* con una mezcla de *Cenchrus purpureus* (Schumacher) Morrone vc. Cuba CT-169 en diferentes proporciones e inocularon con el producto biológico VITAFERT, que contiene levaduras y lactobacilos. Los mejores resultados, en cuanto a proteínas, se obtuvieron al adicionar cantidades entre 4,5 y 6 % del inóculo comercial. Dávila-Hidalgo *et al.* (2016) evaluaron la utilidad nutricional del ensilaje de *T. diversifolia* y *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Estos estudios indicaron que a medida que aumentó la proporción de *T. diversifolia* en la mezcla, se incrementó de forma significativa la cantidad de proteína en el ensilaje. Sin embargo, no ha sido posible comparar los resultados de este indicador en la planta ensilada, debido a que la mayoría de los estudios publicados en la literatura nacional e internacional no se desarrollan en condiciones similares.

Tabla 4. Interacción tiempo y tratamiento para la proteína soluble durante la conservación de los ensilajes.

Tratamiento	Proteína soluble, mg mL <sup>-1</sup>			
	15 días	30 días	45 días	60 días
Control	0,64 <sup>j</sup>	0,66 <sup>i</sup>	0,70 <sup>h</sup>	0,78 <sup>e</sup>
Suero de leche	0,72 <sup>g</sup>	0,77 <sup>e</sup>	0,79 <sup>d</sup>	0,81 <sup>c</sup>
PROBIOLACTIL <sup>®</sup>	0,73 <sup>f</sup>	0,73 <sup>f</sup>	0,93 <sup>b</sup>	0,99 <sup>a</sup>
EE ±	0,015	0,016	0,032	0,033
Valor - P	0,000			

a, b, c, d, e, f, g, h, i y j: Medias con letras distintas difieren según Duncan para  $p < 0,05$

Además de la reducción en la proteólisis, en este trabajo se observó que la adición de PROBIOLACTIL<sup>®</sup> debió aumentar la población de BAL en los ensilajes elaborados. En la tabla 5 se muestra la concentración de este género microbiano, según el tratamiento y el tiempo de muestreo. A los 15 días, los ensilajes no presentaron diferencias entre sí. En el tiempo 30, el tratamiento con PROBIOLACTIL<sup>®</sup> mostró cifras superiores con respecto al control, pero no con relación a los ensilajes inoculados con suero de leche, que tampoco difirieron del control. A los 45 días no hubo diferencias entre ellos, pero sí a los 60, en los tratamientos inoculados y en el control, que presentó los valores más bajos de la evaluación.

La inclusión de los inóculos biológicos (suero de leche y PROBIOLACTIL<sup>®</sup>) demostró que ambos facilitan el predominio poblacional de BAL durante el proceso de fermentación con respecto al forraje ensilado en forma natural (control). Además, estas bacterias utilizan los carbohidratos solubles (CS) para su crecimiento, como principal fuente de energía para formar ácido láctico y favorecer el

descenso del pH. Este es uno de los indicadores más relevantes en la elaboración de ensilados. Se utiliza como referencia o indicador de la calidad fermentativa del forraje, debido a que es una de las transformaciones más radicales que ocurren en el forraje, y porque tiene gran relación con los procesos degradativos durante la conservación (Kung *et al.*, 2018).

En la figura 1 se muestra que a medida que transcurrió el proceso de conservación, los valores de pH tendieron a disminuir. Sin embargo, aunque desde el punto de vista estadístico, los tratamientos no presentaron respuestas durante los tiempos de muestreo, sí hubo variaciones de un tiempo a otro. Para analizar la acción favorable de los inóculos en este indicador, la evolución del pH se debe examinar de manera individual, y considerar como resultados de referencia los valores hallados en el tratamiento control.

El ensilaje no inoculado (control) condujo a un lento descenso en el pH, que solo presentó diferencias con respecto al primer muestreo a partir del día 45. Los tratamientos inoculados con las BAL

Tabla 5. Crecimiento de las bacterias lácticas durante el proceso de conservación

Tratamiento	Tiempo de muestreo, días			
	15	30	45	60
Unidad, Log UFC mL <sup>-1</sup>				
Control	8,18 <sup>b</sup> (15,10x10 <sup>7</sup> )	7,75 <sup>bc</sup> (97,05x10 <sup>7</sup> )	8,69 <sup>ab</sup> (19,25x10 <sup>7</sup> )	6,99 <sup>c</sup> (51,66x10 <sup>7</sup> )
Suero de leche	8,89 <sup>b</sup> (24,46 x10 <sup>7</sup> )	8,80 <sup>ab</sup> (10,50 x 10 <sup>8</sup> )	9,34 <sup>a</sup> (24,58 x 10 <sup>8</sup> )	8,63 <sup>ab</sup> (69,22 x 10 <sup>7</sup> )
PROBIOLACTIL <sup>®</sup>	8,56 <sup>ab</sup> (32,95x10 <sup>7</sup> )	9,06 <sup>a</sup> (19,40x10 <sup>8</sup> )	9,64 <sup>a</sup> (58,39x10 <sup>8</sup> )	9,02 <sup>a</sup> (19,01x10 <sup>8</sup> )
EE ±	0,017	0,039	0,040	0,069
Valor - P	0,000			

a, b y c: Medias con letras distintas difieren según Duncan para  $p < 0,05$ . Datos originales ( )



mostraron un declive desde los 30 días. A partir de este tiempo, el pH se mantuvo estable para el inóculo con suero de leche. Sin embargo, PROBIOLACTIL® continuó descendiendo hasta los 45 días. Los pH finales, si bien no difirieron entre ellos, presentaron cifras de 6,6 (control); 6,5 (suero de leche) y 6,4 (PROBIOLACTIL®), valores que, de acuerdo con los criterios de calidad establecidos para los ensilajes tropicales, resultan inadecuados (Demagnet-Filippi, 2017).

La acidez que alcanzaron los ensilajes durante la conservación es el resultado de la interacción de tres indicadores presentes en el forraje: porcentaje de MS, concentración de CS y capacidad tampón. Las condiciones óptimas para que sus valores controlen los procesos fermentativos se logran cuando los porcentajes de los dos primeros indicadores (MS, CS) son altos, y los del tercero, bajos (Sánchez-Ledezma, 2018). Es por eso que las leguminosas y los forrajes con altos contenidos de proteína se consideran forrajes difíciles de conservar porque presentan bajas concentraciones de CS y los compuestos nitrogenados que generan durante las fermentaciones promueven valores superiores en la capacidad tampón con respecto a las gramíneas (Ojeda-García *et al.*, 2020).

En evaluaciones realizadas por Holguín-Castaño (2016) con botón de oro (*T. diversifolia*) se observaron dificultades para obtener pH adecuados en los ensilajes, cuando se conservó la planta sola o con aditivos basados en BAL, resultados que el autor citado atribuyó a sus elevados valores de capacidad tampón. Para contrarrestar esta limitación, confeccionó ensilajes con diferentes proporciones de *C. purpureum* y encontró los mejores resultados cuando lo incorporó al 67 %. Erazo-Leytón (2018) informó que al ensilar botón de oro con vinaza de

caña de azúcar, no hubo variación en los niveles de pH con respecto al control.

Kung *et al.* (2018) plantearon que algunos ensilajes de leguminosas y pastos, con valores de 30 a 35 % de MS, tienen pH más alto de lo normal. Añaden, además, que el bajo contenido de CS en el forraje puede limitar las condiciones de la fermentación, por lo que no se logra reducir el pH a las condiciones óptimas. Sánchez-Ledezma (2018) señala que el pH final de un ensilado aumenta conforme se incrementa el contenido de MS, ya que se limita la actividad de las bacterias a causa de la falta de agua para sus funciones vitales.

Los resultados de pH en esta investigación podrían ser consecuencia directa del tratamiento de presecado (24 h), con su consecuente pérdida de agua, el incremento de MS a medida que avanzó el tiempo de conservación y la alta concentración de BAL, que pudieron agotar rápidamente todo el sustrato del ensilaje. A pesar de que este resultado (pH) no cubre las expectativas del presente estudio, los análisis organolépticos resultaron favorables para la utilización de estos inóculos bacterianos (tabla 6).

La caracterización del color de los ensilajes, provenientes de forrajes presecados, se debe valorar con moderación porque los pigmentos originales cambian su tonalidad por las oxidaciones que ocurren durante el proceso de deshidratación (Kung *et al.*, 2018). Estas transformaciones se observaron durante el pretratamiento realizado con el forraje que se utilizó en la investigación e indujo a que no se encontraran contrastes entre los tratamientos, excepto a los 60 días, en los que fueron inoculados. Estos mejoraron las puntuaciones por coloración, al cambiar a tonos menos intensos.

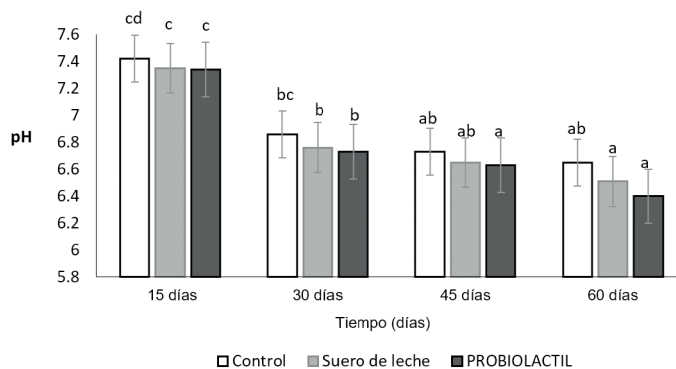


Figura 1. Comportamiento del pH durante el proceso de conservación.

Tabla 6. Evaluación de los ensilajes en función a los parámetros organolépticos

Indicador	Tratamiento	Tiempo de muestreo, días			
		15	30	45	60
Color	Control	Verde oscuro (3)	Verde oscuro (3)	Verde oscuro (3)	Verde oscuro. (3)
	Suero de leche	Verde oscuro (3)	Verde oscuro (3)	Verde oscuro (3)	Verde oliva (5)
	PROBIOLACTIL®	Verde oscuro (3)	Verde oscuro (3)	Verde oscuro (3)	Café claro (4)
Olor	Control	A forraje húmedo (5)	Ácido Acético (4)	Ácido acético fuerte (3)	Putrefacto Olor desagradable en manos (2)
	Suero de leche	A forraje y leche (5)	Ligero olor a ácido acético (4)	A fruta madura (5)	A fruta madura (5)
	PROBIOLACTIL®	A forraje y azúcares (5)	Fuerte olor a azúcares (5)	Ligero olor a fruta madura (5)	A fruta madura (5)
Textura	Control	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)	Contornos poco definidos. Hojas transparentes (3)
	Suero de leche	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)
	PROBIOLACTIL®	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)	Contornos definidos. Hojas no transparentes (4)
Humedad	Control	Alta humedad (2)	Humedece las manos (2)	Humedece las manos (2)	Humedece las manos (2)
	Suero de leche	Humedece poco las manos (4)	Humedece poco las manos (4)	Humedece poco las manos (4)	No humedece las manos (4)
	PROBIOLACTIL®	Humedece poco las manos (4)	Humedece poco las manos (4)	Humedece poco las manos (4)	No humedece las manos (4)

Clasificación individual: 5= Excelente, 4= Bueno, 3= Regular, 2= Malo, 1= No clasificable

El olor es la propiedad organoléptica que mejor permite intuir cómo se desarrolló el proceso de conservación, porque los ácidos orgánicos y compuestos nitrogenados generados durante las fermentaciones presentan aromas peculiares, que facilitan su identificación o predominio, y ambos, en los ensilajes. Sin embargo, cuando el olor predominante es ácido acético, su origen puede provenir de varias fuentes, por preponderancia de bacterias lácticas heterofermentativas y enterobacterias, como resultado de pH elevados que permiten su desarrollo; por fermentaciones de bacterias clostrídicas, que además de aumentar sus concentraciones, generan ácido butírico y aminas, que le confieren a los ensilajes olores a grasas rancias y a materia orgánica en putrefacción (Sánchez-Ledezma, 2018).

Botón de oro, conservada sin inóculo, presentó a partir del segundo muestreo evolución degradati-

va en sus olores hasta finalizar en un producto orgánico en descomposición. Este resultado concuerda con los deficientes valores hallados en los indicadores bioquímicos y microbiológicos evaluados. La introducción del suero de leche en los ensilajes revirtió este comportamiento, porque a los 30 días de conservación se evidenció que las bacterias lácticas comenzaban a dominar las fermentaciones, y así se mantuvieron durante todo el período experimental. Las respuestas con PROBIOLACTIL® fueron más categóricas y estables, lo que ratifica que, en este inóculo, las BAL tienen un potencial de colonización superior a las presentes en el suero de leche. Se conoce que PROBIOLACTIL® posee una concentración ( $10^9$  UFC) de *L. salivarius*, cepa reconocida por su capacidad de crecer en ambientes difíciles y generar antagonismos con otros microorganismos (Sayán *et al.*, 2018; Seo *et al.*, 2019). Su condición probiótica

le confiere al ensilaje de *T. diversifolia* un valor agregado, que repercute favorablemente en el animal.

Los cambios en la textura de los ensilajes con respecto a los forrajes que le dieron origen están vinculados a la calidad con que se realizó la conservación. Mientras más se aproximó a la inicial, mejor se desenvolvió el proceso. Este indicador no presentó variaciones entre los tratamientos hasta el muestreo de los 60 días, cuando el control manifestó cambios estructurales degradativos.

En los ensilajes presecados, la impresión de humedad al tacto proviene de los compuestos que generan las fermentaciones, y se acrecienta cuando la materia orgánica está en proceso de descomposición, como sucedió en el tratamiento control. Las evaluaciones organolépticas integraron y complementaron lo hallado en los otros indicadores, y permitieron ratificar la deficiente capacidad de botón de oro para su conservación de forma individual, la efectividad de los inóculos para mejorar el desenvolvimiento fermentativo de los ensilajes y la superioridad del PROBIOLACTIL® con respecto al suero de leche.

### Conclusiones

Los resultados de pH, MS, proteína, conteo de bacterias ácido lácticas y características organolépticas demostraron que los inóculos microbianos activan el proceso de fermentación en los ensilajes de *T. diversifolia*. Se evidenció la superioridad del PROBIOLACTIL® con respecto al suero de leche.

### Agradecimientos

Se agradece a los profesores y técnicos del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas, y a los investigadores de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, que trabajaron en los experimentos e hicieron posible esta investigación.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos.

### Contribución de los autores

- Marlen Rodríguez-Oliva. Planeación y ejecución de la investigación, análisis de resultados, redacción del artículo.
- Félix Ojeda-García. Ejecución de la investigación, análisis de resultados y redacción final del artículo.
- Yaimara Pozo-Pérez. Ejecución de la investigación y análisis de resultados.
- Ana Julia Rondón-Castillo. Planeación de la investigación, análisis de resultados, redacción del artículo y revisión final.

- Grethel Milián-Florido. Análisis de resultados, redacción del artículo y revisión final.

### Referencias bibliográficas

- AOAC. *Official methods of analysis*. W. Horwitz and G. W. Latimer, eds. Gaithersburg, USA: AOAC International, 2010.
- Castro-Rincón, E.; Sierra-Alarcón, Andrea M.; Mojica-Rodríguez, J. E.; Carulla-Fornaguera, J. E. & Lascano-Aguilar, C. Efecto de la incorporación de abonos verdes de leguminosas y de la inoculación microbiana en la calidad de ensilajes de *Zea mays* L. *Pastos y Forrajes*. 43 (4):315-325. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942020000400315&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942020000400315&lng=es&tlng=es), 2020.
- Dávila-Hidalgo, A.; Lepe-Lopez, M.; Polanco, E.; Saavedra, C. & Guerra-Centeno, D. Determinación del valor nutricional y evaluación sensorial del ensilado de *Sorghum vulgare* y *Tithonia diversifolia*. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*. 17 (10):1-11. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63647454005.pdf>, 2016.
- Demagnet-Filippi, R. *Aditivos biológicos para ensilajes*. Chile: Plan Lechero Watt's. Boletín No. 6 <https://www.watts.cl/docs/default-source/charlas-a-productores/aditivos-biologicos-para-ensilajes.pdf?sfvrsn=4>, 2017.
- Erazo-Leytón, L. E. *Efecto de la adición de vinazas de caña de azúcar en ensilaje de botón de oro (Tithonia diversifolia), sobre el tiempo de fermentación y su composición bromatológica*. Trabajo de grado Médico Veterinario y Zootecnista. Pereira, Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/bc3c171e-b43c-4c0c-a8ff-c199a2999068/content>, 2018
- Ertekin, İ. & Kızıllısimşek, M. Effects of lactic acid bacteria inoculation in pre-harvesting period on fermentation and feed quality properties of alfalfa silage. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 33 (2):245-253, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0801>.
- Galindo-Blanco, Juana L.; Rodríguez-García, Idalmis; González-Ibarra, Niurca; García-López, R. & Herrera-Villafraña, Magaly. Sistema silvopastoril con *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. efecto en la población microbiana ruminal de vacas. *Pastos y Forrajes*. 41 (4):273-280. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942018000400006&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942018000400006&lng=es&tlng=es), 2018.
- Gallego-Castro, L. A.; Mahecha-Ledesma, Liliana & Angulo-Arizala, J. Calidad nutricional de *Tithonia diversifolia* Hemsl. A Gray bajo tres sistemas de siembra en el trópico alto. *Agron. Mesoam*. 28 (1):213-222, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.15517/am.v28i1.21671>.
- Gutiérrez, D.; Morales, A.; Elías, A.; García-López, R. & Sarduy, Lucía. Composición química y degradabilidad ruminal in situ de la materia seca en ensilajes mixtos *Tithonia diversifolia*: *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-169, inoculados



- con el producto biológico VITAFERT. *Rev. cubana Cienc. agric.* 48 (4):379-385. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193033033012>, 2014.
- Holguín-Castaño, Vilma A. *Optimización de Tithonia diversifolia ensilada como alimento para ovinos de pelo*. Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar por el título de Doctor en Ciencias Agrarias. Palmira, Colombia: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/57966/2020-Vilma\\_Holguin.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/57966/2020-Vilma_Holguin.pdf?sequence=1&isAllowed=y), 2016.
- Kung Jr., L.; Shaver, R. D.; Grant, R. J. & Schmidt, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101 (5):4020-4033, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>.
- Londoño, J.; Mahecha, Liliana & Angulo, J. Desempeño agronómico y valor nutritivo de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray para la alimentación de bovinos. *RECIA*. 11 (1), 2019. DOI: <https://doi.org/10.24188/recia.v0.n0.2019.693>.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, Nira J.; Farr, A. L. & Randall, Rose J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1):265-275. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>, 1951.
- Muck, R. E.; Nadeau, E. M. G.; McAllister, T. A.; Contreras-Govea, F. E.; Santos, M. C. & Kung Jr., L. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.* 101 (5):3980-4000, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>.
- Ojeda, F. *Sistema de evaluación para ensilajes tropicales*. Matanzas, Cuba: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas, 2018.
- Ojeda-García, F.; Esperance-Matamoros, M.; Milera-Rodríguez, Milagros de la C. & Cáceres-García, O. Conservación de pastos y forrajes en zonas tropicales. En: Milagros de la C. Milera-Rodríguez, comp. *Recursos forrajeros: herbáceos y arbóreos*. Matanzas, Cuba: EEPF Indio Hatuey. p. 201-253, 2020.
- Ontivero-Vasallo, Yadiana. Caracterización de cinco arbustivas proteicas promisorias para la ganadería cubana. *Pastos y Forrajes*. 44:eE10. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942021000100010&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942021000100010&lng=es&tlng=es), 2021.
- Rodríguez, R.; Galindo, Juana; Ruiz, T. E.; Solis, C.; Scull, Idania & Gómez, S. Valor nutritivo de siete ecotipos de *Tithonia diversifolia* colectados en la zona oriental de Cuba. *LRRD*. 31 (8):119. <http://www.lrrd.org/lrrd31/8/ruiz31119.html>, 2019.
- Rondón-Castillo, Ana J. *Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación integral de las respuestas de tipo probióticas provocadas en estos animales*. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. San José de las Lajas, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, 2009.
- Rondón-Castillo, Ana J.; González, Juliet; Rodríguez, Marlen; Milián, Grethel; Martínez, Marlene M.; Beruvides, A. *et al.* *In vitro* metabolic activity of *Lactobacillus salivarius* and its effect on productive and health indicators of lactating calves. *Cuban J. Agric. Sci.* 54 (2):169-181. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2079-34802020000200169&lng=es&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802020000200169&lng=es&tlng=en), 2020.
- Rondón-Castillo, Ana J.; Milián-Florido, Grethel; Arteaga-Chávez, Fátima; Samaniego-Fernández, Luz M.; Bocourt-Salabarría, R.; Laurencio-Silva, Marta *et al.* Efecto probiótico de *Lactobacillus salivarius* en indicadores microbiológicos e inmunológicos en pollos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 38:21-26. [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_ym/issue/view/1867](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ym/issue/view/1867), 2018.
- Sánchez-Ledezma, W. Potencial de los forrajes para producir ensilaje de calidad. *Alcances Tecnológicos*. 12 (1):49-58, 2018. DOI: <https://doi.org/10.35486/at.v12i1.37>.
- Sayan, H.; Assavacheep, P.; Angkanaporn, K. & Assavacheep, A. Effect of *Lactobacillus salivarius* on growth performance, diarrhea incidence, fecal bacterial population and intestinal morphology of suckling pigs challenged with F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 31 (8):1308-1314, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0746>.
- Seo, H.; Bae, S. & Oh, T. *In vitro*: Antimicrobial effect of *Lactobacillus salivarius* on *Staphylococcus pseud-intermedius*. *J. Vet. Clin.* 36 (2):98-101, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.17555/jvc.2019.04.36.2.98>.
- Tingo-Jácome, F. J. *Efecto de un inóculo de bacterias ácido-lácticas sobre la calidad nutricional y fermentativa de silo de avena (Avena sativa)*. Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magister en Producción y Nutrición Animal. Sangolquí, Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/23146>, 2020.