Ensilado de maíz (Zea mays) usando bacterias productoras de ácido láctico aisladas de la propia planta

Ensilage of corn (Zea mays) using producing bacteria of acid lactic isolated of the own plant

Gerardo Uriel Bautista Trujillo [1]
María Ángela Oliva Llaven [1]
Benigno Ruiz Sesma [1]
Paula Mendoza Nazar [1]
Mario A. Cobos Peralta [2]
M. Pérez-Sato [2]
Federico Antonio Gutiérrez Miceli [3]

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue ensilar plantas de maíz de la variedad Vs-536 a nivel laboratorio con un inoculante bacteriano nativo y comparar su efecto en la concentración de ácido láctico, pH, características organolépticas y nutritivas del ensilado. Para ello se colectaron plantas a los 75 días después de sembrado, se picaron para obtener 1 kg de forraje con humedad de 60-70% y se depositaron en recipientes de plástico cilíndricos. Se trató el forraje contenido en microsilos, con 10 mL de suspensión bacteriana a base de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus durans*, a una concentración de 106 UFC mL-1 y un control sin inoculante, se hicieron cinco repeticiones. Para el aislamiento e identificación de bacterias se utilizó el agar DeMan-Rugosa and Sharpe, Estafilococcus 110 y agar sangre; además de las galerías api 50 CH, Estrep y Staph. Se realizaron análisis químicos para las plantas de maíz pre y post ensilados. Todos los datos se analizaron mediante el modelo estadístico de análisis de varianza, comparando las medias ($P<0.05$) de las variables con diferencias significativas entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey. La utilización del inóculo nativo en los ensilados favoreció la disminución de pH y el incremento de la concentración de ácido láctico, también permitió la estabilización de las propiedades nutricionales del forraje y la disminución de AGV. Se incrementó la predominancia de bacterias productoras de ácido (D-) láctico en los ensilados tratados con inoculantes nativos.

Palabras clave: ensilado, inóculo nativo, ácido láctico, ácidos grasos volátiles (AGV).

ABSTRACT

The purpose of the current study was to ensile corn plants of the Vs-536 variety at laboratory level with a native bacterial inoculant and compare its effect in the concentration of lactic acid, pH, organoleptic and nutritious characteristics of the ensilage. For this purpose, the plants were collected 75 days after planting; they were chopped in order to obtain 1 kg of fodder with humidity of 60-70% and they were placed in cylindrical, plastic containers. The forage was treated in microsilos, with 10 mL of bacterial suspension with *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus durans*, to 106 UFC mL-1 concentration and a control without an inoculants. The process was repeated five times. For the isolation and identification of bacteria, the following were used: DeMan-Rugosa and Sharpe agar, Estafilococos 110, blood, and api 50 CH, Estrep and Staph galleries. Chemical analyses were carried out on the corn plants prior and post ensilage. All the data were analyzed by means of the statistical model of analysis of variance comparing the average ($P<0.05$) of the variables with significant differences among the processing by means of the Tukey Test. The utilization of the native inoculants in ensilage favored the decrease of pH and the increase of the concentration of lactic acid; it also permitted the stabilization of the nutritious properties of the fodder and the decrease of AGV. The predominance of lactic acid (D-)- producing bacteria was increased in the ensilages treated with native inoculants.

Key words: ensilage, inoculant native, lactic acid, volatile fatty acids.

INTRODUCCIÓN

El ensilado es una técnica que permite conservar los alimentos para el ganado y se fundamenta en una fermentación láctica de los azúcares por bacterias denominadas ácido láctico, es de fácil elaboración, sin embargo en ocasiones produce grandes pérdidas forrajeras, para evitar lo anterior, se han empleado aditivos químicos y biológicos como los inoculantes bacterianos. Los inoculantes bacterianos para ensilados son productos biológicos a base de bacterias que tienen la capacidad de producir ácido láctico y disminuir el pH de los silos, dentro de los principales géneros bacterianos utilizados como inoculantes en silos destacan: Lactobacillus, Pediococ-

1 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia C-II, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; México.
2 Colegio de Posgraduados, Chapingo, Estado de México.
3 Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; México.

cus, Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc y Streptococcus, los cuales crecen en rangos de pH de 3 a 4 (Holfzapfel y Schillenger, 1992; Hammes, Weiss y Holzapfel, 1992). La eficiencia de un inoculante depende de la capacidad de las bacterias inoculadas para competir con la flora nativa durante el proceso de ensilaje, así como por la concentración de azúcares y contenido de materia seca del material a ensilar (Woolford, 1984; McDonald, Henderson y Heron, 1991).

Existe poco uso de los inoculantes bacterianos para ensilado en países en desarrollo y sobre todo en climas tropicales, lo anterior se debe en parte a los bajos precios de los productos ganaderos y en gran medida a la falta de experiencia práctica en la técnica de ensilaje (Stefanie, Driehuis, Gottschal y Spoelstra, 1999).

Los pocos productores que han usado los inoculantes comerciales para ensilar no han quedado totalmente convencidos debido a que el inoculante no ha sido efectivo. Lo anterior lo explican Weinberg y Muck (1996) al demostrar que las bacterias ácido lácticas nativas, favorecían mejores rendimientos de producción de ácido láctico y valores menores de pH con relación a los inoculantes comerciales. Cai, Kumai, Ogawa y Nakase (1999) aislaron y aplicaron inoculantes bacterianos nativos a base de *Pediococcus pentosaceus* y *P. acidilactici* en silos de maíz y demostraron que se propiciaban bajos niveles de pH, bajos contenidos de ácido butírico, amonio y acético, con la consecuente elevación de la concentración de ácido láctico.

Por todo lo anterior, es atractivo proponer una alternativa para la fabricación de ensilados que permita mejorar la calidad de conservación de los mismos.

El objetivo de este trabajo fue ensilar plantas de maíz de la variedad Vs-536 a nivel laboratorio adicionando un inoculante bacteriano nativo y comparar su efecto en la concentración de ácido láctico, pH, características organolépticas y nutritivas del ensilado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las plantas de maíz (*Zea mayz*) de la variedad Vs-536 se colectaron manualmente a los 75 días después de haberse sembrado en los terrenos de la zona de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Se seleccionó el fenotipo Vs-536, mismo que es utilizado principalmente en la depresión central del estado de Chiapas, además de favorecer ensilados de mayor calidad (Bautista, 2005).

Proceso de ensilado

Las plantas de maíz se picaron y homogenizaron referidas a base seca para obtener 1 kg de mezcla. Con una humedad del 60-70%, se depositaron en recipientes de plástico cilíndricos con tapa hermética de 15 cm de altura por 12 cm de diámetro, estos recipientes se consideraron como los microsilos. Se trató 1 kg de forraje con 10 mL de solución de inoculante a una concentración de 106 UFC mL-1 (Ortiz, 2001), se hicieron cinco repeticiones. Los microsilos fueron identificados con etiquetas con el nombre del tratamiento y se sellaron completamente después de ser compactadas a presión y sometidos a vacío.

Los microsilos se dejaron reposar durante dos semanas a 30 °C y se procedió a muestrear al final del periodo establecido. Se determinaron las características organolépticas, la concentración bacteriana y se realizaron análisis químicos (AOAC, 1990).

Evaluación sensorial del ensilado

Los indicadores utilizados para evaluar las características sensoriales del ensilado son en orden de importancia: Olor, Color y Textura. Para determinar los parámetros anteriores se destaparon los microsilos en condiciones de esterilidad. Se determinó en el forraje el parámetro de olor a dulce o ácido láctico, poco agradable y desagradable. Para la determinación de color, se observó el forraje ensilado y se tomaron los datos de color verde, pardo verdoso, verde amarillento, verde rojizo, café verdoso, café obscuro o pardo amarillento. La textura del forraje se determinó al tacto y se anotó la textura bien definida, firme y con fácil separación, o en su defecto jabonoso, mal definido, viscoso y pegajoso (Bjorge, 1996; Ojeda y Esperance, 1991 en Tobia, Uribe, Villalobos y Soto, 2003).

Aislamiento e identificación de bacterias en ensilado

Se tomaron 10 g de muestra de cada microsilo y fueron colocados en recipientes que contenían 90 mL de agua destilada estéril. Posteriormente de cada muestra se obtuvo una alícuota de 0.1 mL y se depositó en medio de cultivo denomina-

do DeMan-Rugosa and Sharpe (MRS, selectivo para bacilos lácticos) contenido en cajas de petri desechables (DeMan, Rugosa y Sharpe, 1960 citado por Burgos, Okos y Wankat, 2000) la misma cantidad alícuota se utilizó en agar para Estafilococos 110 y en agar sangre.

Las cajas de petri fueron incubadas durante 48 horas a 30 °C bajo una atmósfera anaerobia mediante una jarra GASPAK de 36 placas y generadores de atmósfera de CO_2 marca GENbox, al cabo de este tiempo se procedió a contar las unidades formadoras de colonia en cada caja. A partir de cada caja de petri se separaron las colonias diferentes y se aislaron en nuevas cajas de petri para incubarse en la forma ya descrita. Después de tres subcultivos, los diferentes monotipos fueron inoculados en tubos de cepa contenido de medio MRS y se procedió a identificar las colonias por medio de las pruebas de Gram, catalasa y una galería de pruebas Api 50 CHL (BioMerieux), Api Staph y Api 20 Strep (BioMerieux, 2000 en Tobia *et al.*, 2003).

Las reacciones observadas del metabolismo bacteriano en pruebas bioquímicas fueron interpretadas como positivas o negativas dependiendo de la identificación numérica del perfil observado en cada una, los datos fueron obtenidos en base al cálculo de su proximidad relativa a los distintos taxones de la base de datos (% id) a través de un programa computarizado API-LAB PLUS versión 3.3.3 (BioMerieux, 2000). Se utilizaron cepas de referencia ATCC de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici* para la comparación morfológica de las bacterias aisladas (ATCC, 2005).

Conservación de las bacterias aisladas

Para la conservación de cada una de las cepas seleccionadas, se inocularon en tubo de cepa con tapón de baquelita conteniendo agar MRS, se incubaron durante 48 horas y posteriormente se adicionó aceite mineral del 10 al 15% VV-1 estéril, finalmente se almacenaron los tubos en refrigeración a 5 °C (Tobia *et al.*, 2003)

Análisis químico

Las muestras de material vegetal pre-ensilado y post-ensilado, se analizaron para materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína (P), cenizas (C) y pH de acuerdo con las técnicas descritas por la AOAC (1990). La fibra detergente neutro (FDN) se analizó de acuerdo a la técnica descrita por Goering y Van Soest (1970).

El contenido de humedad se determinó colocando 2 g del ensilado en crisoles de porcelana a peso constante, los cuales se colocaron al horno a temperatura de 129 °C por 24 horas. Para determinar el pH se usaron aproximadamente 90 mL de agua destilada y se mezcló con 10 g de cada muestra, se dejó reposar por una hora a temperatura ambiente y se agitó cada 15 minutos. El extracto se decantó en un vaso de precitado de 100 mL y se midió el pH con un potenciómetro marca Hanna previamente calibrado con buffer pH 4, 7 y 10. La concentración de ácido láctico se analizó de acuerdo con la técnica colorimétrica descrita por Barker y Sumerson (1941) Tylor (1995) y por Bartnett (1951). Mediante diluciones se elaboró la curva estándar con lactato de litio. Las muestras problema se midieron con ácido sulfúrico, sulfato de cobre y parafenil fenol, la lectura se realizó a 570 nm.

La determinación de proteína se realizó mediante el método de Kjelhdal. Para la determinación de cenizas, se pesaron 2 g de muestra y se depositaron en un crisol de porcelana, se quemó primeramente en una parrilla y posteriormente se incineró durante 3 horas en una mufla a 550-600 °C, se enfrió el crisol dejándolo en reposo en un desecador y finalmente se pesó para calcular el porcentaje de cenizas. Se midió la concentración de ácido butírico, ácido acético y ácido propiónico mediante cromatografía de gases, para ello se acidificó la muestra con ácido metafosfórico al 25% en una proporción 4:1 de muestra: ácido metafosfórico, las muestras se depositaron en viales de 2 mL y se centrifugaron a 15 000 rpm durante 5 minutos, posteriormente las muestras se depositaron en viales de 1 mL y se refrigeraron a -4 °C, se analizaron las muestras en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer, Clarus 500. La muestra testigo fue una solución en proporción 4:1 de solución de ácido butírico, propiónico y acético: ácido metafosfórico (Erwin, Marco y Emery, 1961).

Diseño experimental y evaluación estadística.

Se analizó la composición química de los ensilados, para ello se establecieron dos tratamientos:

Tratamiento 1: Plantas de maíz de variedad Vs-536 con inoculante bacteriano.

Tratamiento 2: Plantas de maíz de variedad Vs-536 sin inoculante bacteriano.

Todos los datos fueron analizados estadísticamente con el análisis de varianza, comparando las medias ($P<0.05$) de las variables con diferencias significativas entre los tratamientos mediante la prueba de Tukey. Se empleó el programa SAS (Sistema de Análisis Estadístico SAS, 1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de bacterias aisladas en ensilados con inoculante nativo

En la Figura 1 se observan los resultados referentes a la concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el silo tratado con inoculante bacteriano y en los silos sin inoculante utilizando la variedad Vs-536, cabe destacar la elección de esta variedad en virtud de los mejores resultados obtenidos con este tipo (Bautista, 2005). Se aprecia mayor concentración (UFC g-1 de silo) en el silo tratado con inóculo nativo en comparación con el silo sin tratamiento para los géneros *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus platarum* y *Lactobacillus brevis* con 3.01 x 1012, 8.33 x 1012, 1.02 x 1010, 1.76 x 1011 UFC g-1 de silo, respectivamente. Los géneros bacterianos *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus paracasei* estuvieron presentes en mayor concentración en los silos sin inóculo nativo con 2.59 x 105 y 2.28 x 106 UFC g-1 de silo. Weinberg y Muck (1996) reportan que el adicionar a ensilados inoculantes bacterianos como *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus* sp., se favorece el predominio de estos mejoradores y que los inoculantes nativos se adaptan mayormente a las condiciones de la región. Deshmukh y Patterson (1997) describen el uso de inóculos para estimular la fermentación de silos con plantas de maíz y describen a los géneros *Lactobacillus plantarum*, *Estreptococcus faecium* y *Pediococcus acidilactici* como algunos de los cultivos más exitosos. Bolsen (1999) encontró en 1 000 ensilados de plantas de maíz y 200 estudios de laboratorio, que los inóculos bacterianos son benéficos en más del 90% de las comparaciones. Steidlova y Kalac (2003) utilizaron los géneros *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus* casei y *Enterococcus faecium* en concentración de 1 x 106 UFC mL-1, logrando promover el crecimiento de bacterias ácido lácticas en los ensilados.

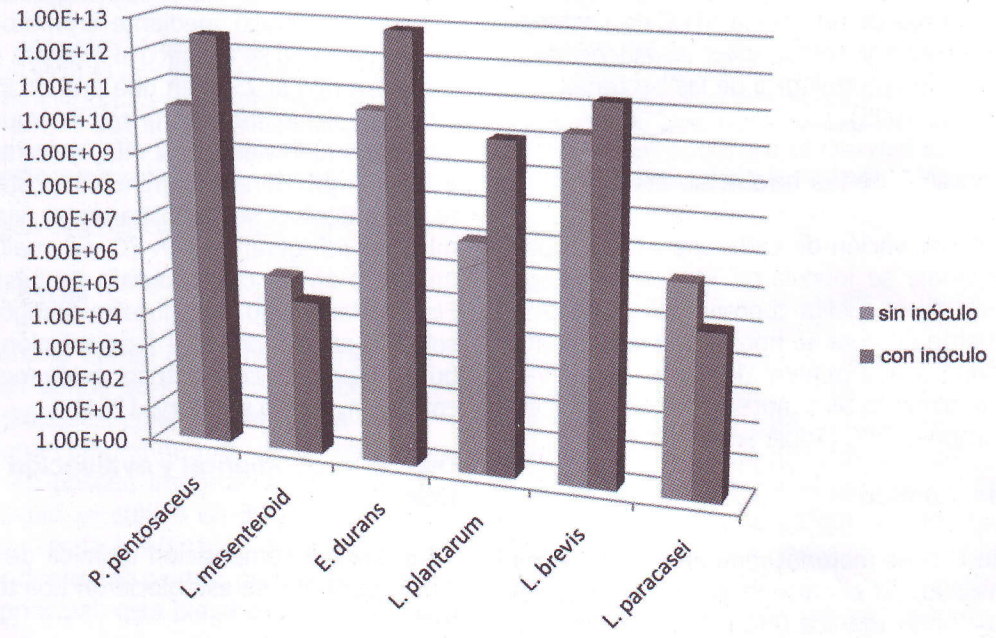

Figura 1. Concentración de bacterias aisladas de silos tratados con inoculante nativo y sin inoculante con la variedad Vs-536.

Cuadro 1.- Comparación de los valores nutritivos del ensilado del genotipo Vs-536 con y sin inoculante

	pH	ÁI	P	FD	C	MS	MO	CS	AGV
T	3.8 a	49b	13 a	12.7a	11ª	32a	34a	16a	13 a
I	3.4b	62a	14 a	13 a	12ª	31b	35a	15a	9b

P < 0.05, Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes. Sistema SAS.
AGV (Ácido acético g Kg-1 de MS).

Características bromatológicas obtenidas durante el proceso de ensilado con inoculante nativo

Se observa en el Cuadro 1 la comparación de medias de los valores de pH, ácido láctico (Al, g kg-1 de MS), proteína (P), fibra detergente neutro (FD), cenizas (C), materia seca (MS), materia orgánica (MO), carbohidratos solubles (CS % de MS) y ácidos grasos volátiles (AGV) en g Kg-1 de MS del ensilado con inoculante nativo (I) en comparación con el ensilado sin inoculación (T) obtenidos con la variedad Vs-536. Se aprecia diferencia estadística en los valores de pH, siendo de 3.4 en el silo tratado con inóculo y de 3.8 en el silo sin inoculante, la concentración de ácido láctico fue diferente estadísticamente, ya que el silo con inoculación obtuvo una concentración de 62 g kg-1 de MS en comparación con el silo sin inóculo de 49 g kg-1 de MS. Respecto a la materia seca se observa diferencia estadística entre los tratamientos, siendo de 30% en el caso del silo tratado con inóculo y de 32% en el silo no tratado. En la concentración de proteínas, FDN, cenizas, materia orgánica y carbohidratos solubles, no se encontró diferencia estadística. Se detectó ácido acético en ambos tratamientos y fue estadísticamente diferente, la mayor concentración se halló en el testigo con 13 g Kg-1 de MS en comparación con el silo inoculado con una concentración de 9 g kg-1 de MS de ácido acético.

El pH obtenido en los ensilados tratados con inóculo fue bajo y este resultado concuerda con los trabajos de Bolsen (1999) en donde halló que utilizando plantas de maíz en 1 000 ensilados y 200 estudios de laboratorio, los ensilados inoculados tuvieron fermentaciones más rápidas y más eficientes, disminuyendo el pH por debajo de 4. Bolsen, Brent y Uriarte (2001), presentaron resultados de 28 ranchos y la evaluación de 71 ensilados, demostrando que los inóculos bacterianos consistentemente mejoraron la eficiencia en la fermentación, la recuperación de MS y la eficiencia alimenticia. Weinberg y Muck (1996) reportaron que el adicionar a ensilados inoculantes bacterianos, como *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus* sp., se favorece al predominio de estos mejoradores y el pH decrece principalmente debido al incremento en la concentración de ácido láctico. Zhang, Tanaka, Uegaki, Cali y Kobayashi (2000), mencionan que el utilizar inóculos de bacterias homofermentadoras como *Lactobacillus plantarum* favorece la producción de ácido D(-) láctico y encontró una disminución de pH a niveles de 3.75; también reportaron una concentración de ácido acético de 7.3 g Kg-1 de MS. Steidlova y Kalac (2003) utilizaron inoculantes bacterianos en ensilados de plantas de maíz y disminuyeron el pH a niveles de 3.7. Kung, Chen, Kreck y Knutsen (1993) reportaron que la inoculación microbiana puede mejorar el valor nutritivo del ensilado de maíz.

CONCLUSIONES

Se aislaron y caracterizaron las bacterias ácido lácticas homofermentativas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Pediococcus pentosaceus*. También se aislaron las siguientes bacterias ácido lácticas heterofermentativas: *Enterococcus durans*, *Lactobacillus paracasei* y *Leuconostoc mesenteroides*. Todas las bacterias anteriormente mencionadas se encontraron en los silos independientemente del tratamiento.

En relación con las características sensoriales no existió diferencia entre los silos tratados con inoculantes y los testigos, ya que todos presentaron un olor dulce agradable, un color verde pardo y una textura bien definida de fácil separación.

La utilización del inóculo nativo en los ensilados favoreció la disminución de pH y el incremento de la concentración de ácido láctico, también favoreció la estabilidad de las propiedades nutricionales del forraje como por ejemplo proteína, fibra detergente neutro, ceniza, materia seca, materia orgánica y carbohidratos. La concentración de ácido acético disminuyó con la utilización del inoculante bacteriano nativo.

Se incrementó la predominancia de bacterias homofermentadores productoras de ácido D (-) láctico y se disminuyó la población de bacterias ácido lácticas heterofermentativas productoras de ácido L (+) láctico en los ensilados tratados con inoculantes nativos.

AGRADECIMIENTO

Este proyecto fue financiado por Fundación Produce Chiapas, A.C.

REFERENCIAS

A.O.A.C (1990). Official Methods of Analysis, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC. Pp. 69-70.

ATTC (2005). The American Type Culture Collection. *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*. Manassas, Virginia 20110. USA. Microbiologics, Inc.

Barker, S.B., H.W. Sumerson (1941). The colorimetric determination of Lactic Acid in Biological Material. J. Biol. Chem. 138: 535-554.

Bartnett, J.G. (1951). The colorimetric Determination of Lactic Acid in silage. Department of biochemistry the University Sheffield. Biochem J. 49:527-529.

Bautista, T. G. (2005). Obtención de un inoculante bacteriano para ensilar planta de maíz. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Diciembre. pp. 13 -37.

BioMerieux (2000). Api system 50 CH, Api system 20 Estrep, Api system Estaph. S.A. Lyon/France. Pp. 1-2.

Bjorge, M. (1996). Ensiling process. Pág. (http://www.agric.gov.ab.ca/crops/forage/silage/silag2.htm) 10 de septiembre de 1996. en: Cañeque, 2003. Tecnología de los ensilados. Pp. 64.

Bolsen, K. (1999). Silage management in North America in the 1990s. p. 233-244, in: T.P. Lyons and K.A. Jacques (eds) Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Of the 15th. Annual symposium. Nottingham, UK: Nottingham Univ. Press.

Bolsen, K., B. Brent, E. Uriarte (2001). The silage triangle and important practices often overlooked. California Animal Nutrition Conference. California, EE.UU. Pp. 60-65.

Burgos, R.C., M.R. Okos, P.C. Wankat, (2000). Kinetic Study of the Conversion of Different Substrates to Lactic Acid Using *Lactobacillus bulgaricus*. Biotechnol. Prog. 2000, 16, 305-314.

Cai, Y., S. Kumai, M. Ogawa, T. Nakase (1999). Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. Appl Environ Microbiol. Jul; 65(7): 2901-6.

DeMan, J.C., M. Rugosa, M.E. Sharpe. (1960). Medium for Cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bacterial. 23,130.

Deshmukh, A.C., P.H. Patterson (1997). Preservation of hatchery waste by lactic acid fermentation. 1. Laboratory-scale fermentation. Poultry Sc., 76: 1212-1219.

Erwin, E.S., G.J. Marco, E. Emery (1961). Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. J. Dairy Sci. 44, 1768-1776.

Goering, H.K., P.J. Van Soest (1970). Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). ASDA Agricultural Handbook No. 379, Washington, DC, pp. 1-37.

Hammes, W.P., N. Weiss, W. Holzapfel (1992). The Genera *Lactobacillus* and Carnobacterium. p. 1535-1594, in: Balows *et al.*, 1992, q.v.

Holzapfel, W.H., U. Schillinger (1992). The Genus *Leuconostoc*. p. 1508-1534. in: Balows *et al.*, 1992, q.v.

Kung L., J.H. Chen., E.M. Kreck, K. Knutsen. (1993). Effect of microbial inoculants on the nutritive value of corn silage for lactating dairy cows. J Dairy Sci. Dec; 76(12):3763-70.

McDonald, P., A.R. Henderson, S.J. Heron (1991). The Biochemistry of Silage. 2nd ed. Marlow, UK: Chalcombe Publications. McPherson. H.T. & Violante. P. 1966. Ornithine, putrescine and cadaverine in farm silages. J. Sci. Food Agr., 17: 124-127.

Ojeda, F., O. Cáceres, M. Esperance (1991). Conservación de forrajes. Editorial Pueblo y Educación. Cuba. p. 80.

Ortiz, R.M., M.A. Galina (2001). Engorda de bovinos con silo de Maíz, solo, acidificado y enriquecido con un suplemento de lento consumo en el trópico. En memorias de la XXXVII reunión nacional de investigación pecuaria Chiapas, 2001.

Statistial Aalysis Systems Institute Inc. (1988). SAS User´s Guide. Release 6.03 edn. SAS Institute Inc., Cary, NC, pp. 549-640.

Stefanie, J.W. O.E. Driehuis, J. Gottschal, S. Spoelstra (1999). Silage fermentation processes and theirmanipulation. FAO. Institute for Animal Science and health (ID-DLO). Pp. 3-15.

Steidlova, S. P. Kalac (2003). The effects of using lactic acid bacteria inoculants in maize silage on the formation of biogenic amines. Arch Tierernahr. Oct; 57(5): 359-68.

Taylor, K.A. (1995). A simple Colorimetric Assay for Muramic Acid and Lactic Acid. Applied Biochemistry and Biotechnology. 56:49-58.

Tobia, C.L., E. Uribe, H. Villalobos, I. Soto (2003). Aislamiento, selección y caracterización de bacterias ácido lácticas en ensilajes de soya. Agronomía costarricense: 20, 43-50.

Weinberg, Z.G., R.E. Muck (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. FEMS Microbiol. Reviews. 19, 53-68.

Woolford, M.K. (1984). The silage fermentation. (Microbial series, No. 14) New York, NY, and Basle; Marcel Dekker.

Zhang, J.G., O. Tanaka, R. Uegaki, Y. Cali, R. Kobayashi (2000). The effect of inoculation and additives on D(-) and L (+) lactic acid production and fermentation quality of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq) silage. J. Sci. Food Agricult. 80, 2186-2189.