

CATEDRA DE AGRICULTURA
Catedrático: Prof. Dr. ANDRES SUAREZ Y SUAREZ

**Aspectos químicos y microbianos del ensilado de
alfalfa con el empleo de diversos conservadores**

Por Francisco Villalón Villalón

INTRODUCCION

La gran extensión que como cultivo forrajero tiene la alfalfa en todo el mundo, y la especial importancia que reviste en nuestro país, ha despertado un indudable interés en estudiar el modo de evitar las enormes pérdidas que se producen en esta planta cuando es preciso conservarla por medio del tradicional sistema de henificación.

Entre los procedimientos propuestos ocupa, evidentemente, un destacado interés, la desecación artificial de la alfalfa joven, pero no menor importancia reviste el ensilado de esta forrajera. Si lo que se quiere obtener es un buen concentrado, con la conservación al máximo de los elementos nutritivos de la planta, es indudable que la desecación artificial es el medio o recurso de elección. Por el contrario, si lo que se necesita es un forraje en estado verde, con escasas pérdidas en principios nutritivos y de bajo coste, en ese caso el ensilado puede cumplir los mejores servicios.

De todos son conocidas, sin embargo, las grandes dificultades que encierra el ensilado de leguminosas. Por condiciones derivadas de su estructura y composición, presentan inconvenientes para ser conservadas por los procedimientos de ensilado basados en fermentación natural y esto ha hecho que su conservación esté vinculada, de una manera especial, al empleo de conservadores. De aquí el interés que en estos años ha despertado el estudio de las características de estos conservadores y su idoneidad para cumplir los específicos fines que con ellos se persigue al incluirlos en la masa de forraje al ensilar.

Resulta imposible, por su extensión, estudiar de una manera completa y exhaustiva, la evolución seguida por los métodos de ensilado, las técnicas de ensilar y los tipos de silos; por ello nos vemos forzados a limitar el estudio de esta evolución histórica a los sucesos que se centran en la adición de sustancias al silo, ya que hacia este específico problema va dirigido nuestro estudio.

La bibliografía italiana atribuye al profesor GIGLIOLI (29) el haber vislumbrado en 1885 las ventajas de los ácidos minerales. Este hecho que ponen en duda muchos investigadores nos parece verosímil, ya que, viviendo en pleno ardor la época pasteriana, se le ocurriría provocar la inhibición de esta fermentación con el uso de ácidos minerales. WATSON (87) dice que fue MONTARINI, en 1891, el primero que utilizó el ácido clorhídrico con el mismo fin. Trabajos que sirvieron a VIRTANEN para razonar científicamente su método, podrían ser los de REMM y WEISKE en 1914 (67) y los de PETERSON y FRED en 1921 (62) que iniciaron el conocimiento de la bacteriología del silo. EDIN y SANBERG (26) comprobaron la calidad de algunas cosechas ensiladas determinando el pH y coligieron de sus experimentos que este dato está intimamente vinculado a la calidad del producto. WOODMAN y col. 1926 (88) analizaron el valor nutritivo del forraje y anotaron las ventajas de ensilar cosechas jóvenes. Estos pudieron ser los postulados que motivaron a VIRTANEN a investigar la aplicación de ácidos minerales a la conservación de los forrajes en estado verde. El sistema A. I. V. se apoya en el efecto que estos ácidos tienen, al hacer descender el pH. sobre la fermentación láctica, aunque se trate de cosechas de leguminosas muy jóvenes. Su demostración aclaró que la conservación de los forrajes en estado verde podía ser una fermentación dirigida.

Entendiendo el ensilado con un criterio científico, se inician profundos trabajos sobre los distintos problemas que plantean sus aspectos

químicos y microbiológicos. WATSON, (87) resume en una monografía los avances obtenidos hasta 1949 en la química del ensilado, y tiene otros trabajos de gran interés sobre las fermentaciones del silo (84,85); ALLEN y sus colaboradores (2) prueban el efecto de aditivos y cultivos bacterianos en el ensilado; CUNNIGHAN y los suyos en 1940, (20,21) estudian la microflora de los ensilados A. I. V.

MABBIT (48) continuó investigando en torno a la idea suscitada por TRAUTWEIN en 1928 de estudiar independientemente la actuación de los enzimas vegetales y bacterianos. Inspirándose en la caja de REYNNER para la cría de animales en ambiente exento de gérmenes, cultiva alfalfa que cosecha y ensila asépticamente, y llega a comprobar que las bases volátiles tienen origen en enzimas vegetales ya que están presentes en cantidades similares en ensilados realizados sin precauciones asépticas tan extremadas. KEMBLE (40) no está de acuerdo y lo atribuye a una acción enzimática microbiana.

MURDOCH y BALCH y col. (52,7) estudiaron el efecto del troceado de los forrajes sobre la calidad del producto final ensilado, así como también lo hicieron WATSON y NASH, (60,88) y GORDON (34), estando de acuerdo todos en destacar que la desecación parcial previa (parcial wilting) da una mayor seguridad al ensilado de forrajes estacionales en algunos componentes de los forrajes y su repercusión en el ensilado es presentada por SWITH, (74). Revisiones de aspectos químicos y microbiológicos son las publicaciones de VANBELLE (80) y ANTOINE (3).

La determinación de ácidos orgánicos, (láctico, acético, butírico, etcétera) y azúcares solubles, como aspectos importantes de esta fermentación, ha sido estudiado por varios investigadores. (65,89,90).

DIRKS (24) en 1952, propuso el empleo del ácido fórmico, producto que favorece la conservación del forraje por la enorme disociación del ión H- y por su potente poder bactericida. Los daneses lo han comparado con el A. I. V. y JARL (38), en sus últimos experimentos alimentando vacas con ensilados A. I. V. y de ácido fórmico comunica que la producción de leche fue virtualmente idéntica. El ácido fosfórico no ha tenido tanto éxito.

Los dos aparecieron en combinaciones con otros productos. Los derivados del ácido fórmico en forma de formiato de calcio y con el nitrato sódico dieron resultados muy discutidos; HAUSSMANN, lo presenta como buen conservador y lo mismo BREIREM (11). Por el contrario PETERSON, BURRIS y col. (62) en pruebas repetidas para detectar la presencia de

NO_2 en los ensilados, por los trastornos que ocasiona a los animales, observaron que cuando el nitrato sódico era el conservador, la cantidad aumentaba hasta diez veces en relación con testigos con otros conservadores.

El ácido glicólico fue empleado por MURDOCH y col. (53,54) intentando aprovechar su gran poder reductor. Hay en el comercio un derivado suyo, el acetato-halogenado de glicol, cuya primera noticia la encontramos en MURDOCH (54) quien advierte que este compuesto ha tomado el nombre comercial "Sovilon".

KNOTT y SKAGGS, (42,72) en la Estación Agrícola de Pennsylvania comenzaron a manejar el SO_2 como conservador de los forrajes, el resultado fue magnífico y pronto se generalizó su uso en los demás Estados. DUFOUR y col. (23) le proponen como un excelente conservador para las leguminosas con alto contenido en humedad.

Pero el conservador más extendido en la práctica en los Estados Unidos es el metabisulfito sódico, al que ha dedicado también una gran atención la bibliografía francesa (3,8) e inglesa (54). Los primeros que lo estudiaron fueron BRATZLER, COWAN y SWIFF en los Estados Unidos (9,10) GORDON y col. (31) y MURDOCH y col. (56) en Inglaterra.

La gran ansiedad por buscar la forma de conservación ideal es tal que GROSSBARD ha llegado a probar la esterilización de la masa ensilada con radiaciones (35).

Si el ensilado es fundamentalmente una fermentación láctica, no podía pasar desapercibido el empleo de fermentos lácticos para dirigir en este sentido el proceso. El examen de los forrajes verdes ha demostrado que no siempre el número y calidad de gémenes lácticos, —junto con la flora de acompañamiento— resulta suficiente para que pueda realizarse una actividad láctica dominante en el sentir de ANNA STIRLING (71), KROULIK BURKY y col. (44,45), ALLEN y col. (1).

El interés del ensilado ha desbordado su aplicación exclusiva a la conservación de forrajes, en la actualidad otros productos destinados también a la alimentación del ganado tales como los deshechos de las industrias de pescado, también se ensilan (36).

FACTORES QUE CONDICIONAN LA FERMENTACION LACTICA

La instauración de una fermentación láctica en el forraje ensilado está subordinada a una serie de factores entre los que podemos

citar: temperatura, exclusión del aire, presencia de materiales hidrocarbonados y pH.

La temperatura está íntimamente ligada con la presencia de aire en el silo. Una enérgica compresión durante el llenado y un sobrepeso que mantenga la masa compacta son fundamentales para obtener un ensilado frío, entre 15-20° C. ARNAUDI (5) estudió la intensidad de crecimiento del *Lactobacillus plantarum* en relación con los responsables de fermentaciones nocivas tales como *Clostridium butyricum* y *Bacillus putrefaciens*, en función de la temperatura. A 14-16° C. *Lact. plantarum* se multiplicaba intensamente mientras que los otros dos permanecían estacionados. El ligero marchitamiento mencionado anteriormente (83,60,80,3) exige el trocear los forrajes para evitar la formación de bolsas de aire, con ellos se favorece también la fermentación láctica al facilitar, con la salida de los jugos, los nutrientes indispensables para el metabolismo de esta microflora (NASH, 59; MURDOCH y BALCH, 51,7,8, etc.) Además durante la desecación aumentan los azúcares solubles por hidrólisis de los complejos que forman las paredes de las células vegetales (57).

El empleo de sustancias hidrocarbonadas como condicionadores en el ensilado de leguminosas, es sólo parcialmente útil. Las más usadas han sido las melazas, desde 10 a 30 kilos por tonelada de forrajes diluidas en agua en la proporción de 2 : 1, harina de cereales, suero de leche, etc. El maíz y la cebada mejoran la calidad de los forrajes que se ensilan con un exceso de humedad (34). El ácido láctico formado en la fermentación de los azúcares es un auténtico conservador del silo y los niveles que alcanza están estrechamente relacionadas con el pH (71).

ARCHIBARD y col. reuniendo resultados de ensayos realizados desde 1937 a 1953 consideran el pH como uno de los datos más estimables para valorar el ensilado (4), y añaden que las leguminosas dan cifras más altas, sin que por ello el producto tenga menos valor nutritivo: con ellos coinciden los resultados de MURDOCH (53); BAKER y VOLKER (6) y también los nuestros.

Si el ácido láctico procede de la fermentación de los azúcares cuando los conservadores tengan una misión distinta que la de hacer descender el pH, hay que acompañar las leguminosas de hidratos de carbono, a menos que la cosecha sea troceada, y ligeramente desecada BROWN y SMITH (12) han estudiado detenidamente el efecto de las melazas añadidas al silo.

En la primera fase del ensilado el proceso más notorio es la respiración celular; inmediatamente después se inicia el desarrollo de las bacterias que acompañan al forraje. La flora de las plantas verdes, según KROULIK (44,45), está representada por lactobacilos, coliformes, esporulados, cocos diversos, levaduras, actinomices, hongos, etc. Si el contenido en humedad del forraje, llega a un 67 y 70 por 100 repercute sobre los lácticos positivamente, lo contrario sucede a la butírica según comunican diversos autores (4,59,60).

Todos los conservadores, aunque actúen por diferentes caminos, tienden a implantar una fermentación, en la que los protagonistas principales sean los lácticos, y a la inhibición de las fermentaciones nocivas. Entre las fermentaciones indeseables la putrefacción y la butírica son las más importantes por afectar a toda la masa del silo cuando se desarrollan. La actividad de hongos y levaduras, por sus exigencias en oxígeno, quedan circunscritas a las capas superficiales evitándose fácilmente si el silo se cubre y cierra adecuadamente. El *Cl. saccharobutyricum*, de actuar lo hace cuando la fermentación láctica no ha tenido lugar y si ésta apareció el agente es el *Cl. Tirobutyricum* Fermentador de láctatos (69,70,4,13).

Es pues evidente que la producción de un buen ensilado, con el mínimo de pérdidas, baja proteolisis y ausencia, o sólo pequeñísimas cantidades de ácido butírico, depende de la formación de una acidez suficiente que impida, en posteriores estudios, la actividad de las bacterias proteolíticas y anaerobias obligados.

La acidez del medio era creada, y limitada, en los forrajes ensilados, con el empleo de ácidos minerales u orgánicos. Sin embargo el propio VIRTANEN en su conferencia sobre *Conservación de forrajes*, leída en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (81) decía: "El futuro nos demostrará si el método de fermentación es susceptible de ser perfeccionado hasta garantizar la conservación del forraje sin recurrir a la adición de ácidos." En el decenio 1950-60 una ingente cantidad de trabajos da continuidad a las pruebas que con el SO_2 comenzaron KNOTT y col. (42,43,25) a los que siguieron los trabajos de BRATZLER y col. (9,10,31) con el metabisulfito sódico, que dan contestación a la pregunta de VIRTANEN.

Es pues evidente que estamos ante una nueva etapa en la que el uso de conservadores, solos o asociados a hidrocarbonados e inóculos lácticos, va a ser la norma. Entre los primeros destacan por su interés,

como lo demuestran las pruebas ya realizadas, el metabisulfito y el acetato halogenado de glicol, por eso nos hemos propuesto estudiar el comportamiento de éstos, solos, o con el auxilio de los coadyuvantes (hidrocarbonados, inóculos, troceado, etc.) en un forraje tan universal y por otra parte tan difícil de ensilar como es la alfalfa.

Metabisulfito sódico ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_5$). Los trabajos de BRATZLER y COWAN (9,10) son los primeros en presentar el metabisulfito como un conservador en los procesos del ensilado. Pretenden utilizar, con más ventajas, el efecto del SO_2 (25,42,72) a partir de un producto sólido y de más fácil aplicación.

BROWN (12) y MURDOCH (54,55) y Mc PHERSON y col. (50) dicen que origina una esterilización parcial de la masa, dando un ensilado con bajo contenido en bases volátiles y ácido butírico y en cambio cifras de ácido láctico muy estimables.

Nuestros resultados demuestran también que las concentraciones habitualmente usadas inhiben las fermentaciones proteolíticas y butíricas respetando la láctica, aunque sin alcanzar esta proporciones tan desmesuradas como en su ausencia. Con este producto también se ha comprobado que mejora sus efectos si los forrajes son ligeramente desecados previamente a diferencia del SO_2 (66) que va mejor con forrajes de alto contenido en humedad. STALLCUP (75), que lo probó comparándolo con forrajes muy húmedos lo califica de buen conservador.

La uniforme distribución en toda la masa es esencial, si se trabaja en gran escala pueden servir con este objeto máquinas espolvoreadoras de otros usos agrícolas. En solución acuosa pierde efectividad. Como dijimos más atrás el metabisulfito sódico es un cuerpo sólido que actúa al dejar en libertad el ion SO_2 poderoso agente reductor y también actúa provocando una ligera acidificación pues el SO_2 , con la humedad del forraje puede formar ácido sulfuroso (SO_3H_2). Pero su acción fundamental radica en que el ion SO_2 es capaz de usar grandes volúmenes de O_2 deteniendo la respiración aerobia (estriativamente aerobia) y la actuación de los enzimas microbianos y vegetales. Se crea un estado de semianaerobiosis ideal para la proliferación de la microflora láctica. En estas condiciones el forraje conserva un color y olor que recuerdan al forraje fresco, sufriendo muy pocas pérdidas.

Las ventajas del metabisulfito sódico frente al SO_2 empleado por KNOTT y col. (25,42,71) puede resumirse así: a) más fácil aplican-

ción; b) distribución más uniforme, c) pocos riesgos en su empleo, d) bajos costes. El que dijéramos que una desecación parcial no le perjudica en su actuación a diferencia del SO_2 , no quiere decir que ello sea obligado, pues también en forrajes con alto contenido en humedad su empleo ha sido positivo. Se viene agregando en la cantidad de 4-5 kilos por Tm. nosotros lo probamos en la proporción de 4-6 kilos por tonelada de forraje ensilado.

Acetato-halogenado de glicol.—Los trabajos llevados a cabo con este producto son muchísimo más escasos. Es menos conocido y MURDOCH (54) en 1956 dice que no tiene referencias experimentales de su uso. No describe tampoco su mecanismo de acción.

Este producto determina una esterilización parcial de la masa respetando los gérmenes lácticos y permitiendo así que inicien su fermentación. Estos, al atacar a los carbohidratos, producen ácido láctico cuya acidez es mejor mantenida al incorporar el conservador que dificulta el posible advenimiento de la fermentación proteolítica y butírica cuyo pH de actuación está comprendido entre 6-7. Este producto se encuentra ya en el comercio. Se utiliza generalmente de 100-130 gramos por tonelada de forraje, diluidos en 45 litros de agua.

Inóculos lácticos.—ALLEN, y col. (2) ha ensilado con el auxilio de inóculos lácticos y aditivos hidrocarbonados, suero de leche, harina de cebada, etc.

STIRLING, (76,77) ha contribuido mucho en este aspecto, así como KROULIK y col. (44,45) y MC PHERSON (50); este último comprobó el efecto del metabisulfito combinado con inóculos lácticos (0,2 gr. para 50 gramos de forraje y un inóculo láctico) y observó que el inóculo usado sin metabisulfito ofrecía un forraje de color más amarillo y con mayores pérdidas.

Nosotros estudiamos el efecto del metabisulfito sódico y del acetato-halogenado de glicol sobre los inóculos lácticos.

PARTE EXPERIMENTAL

PLAN DE TRABAJO

Por no existir trabajos experimentales en nuestro país, relacionados con el uso del metabisulfito sódico y acetato-halogenado de glicol,

tan ampliamente extendidos en otros países, ni tampoco estudios que traten de las ventajas que se siguen al ensilar forrajes marchitos y troceados, pretendemos investigar el resultado de ensilar alfalfa, nuestra forrajera por excelencia y de difícil conservación, con el empleo de estos conservadores y tratamientos previos. Algo todavía no aclarado en relación con el ensilado es la posible ventaja de incorporar un inóculo láctico que asegure la fermentación deseada y esto es importante pues el ensilado es, en gran medida, una fermentación láctica.

Combinando conservadores, inóculos lácticos, melazas y tratamientos previos del forraje, proyectamos tres series de experimentos con cinco variantes a escala de laboratorio (fotografías 1, 2, 3). En una prueba incluimos el método A. I. V. como variante, con el objeto de contrastar la desmineralización que sufren los forrajes ensilados por este sistema frente a otros conservadores.

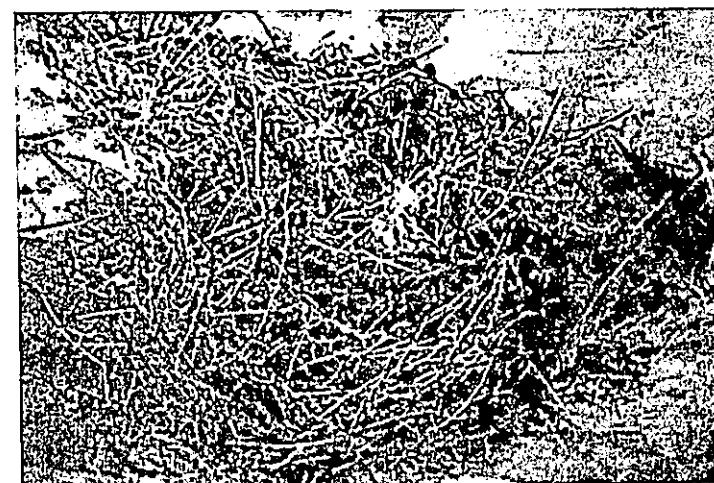


Fig. 1

Aspecto del forraje ensilado transcurrido el período de conservación.

La duración de cada prueba es de cuatro semanas, fecha a partir de la cual en el silo ha ocurrido todo lo que tenía que pasar en el forraje para mantenerse en buen o mal estado de conservación. Este tiempo se considera suficiente en el decir de toda la bibliografía consultada.

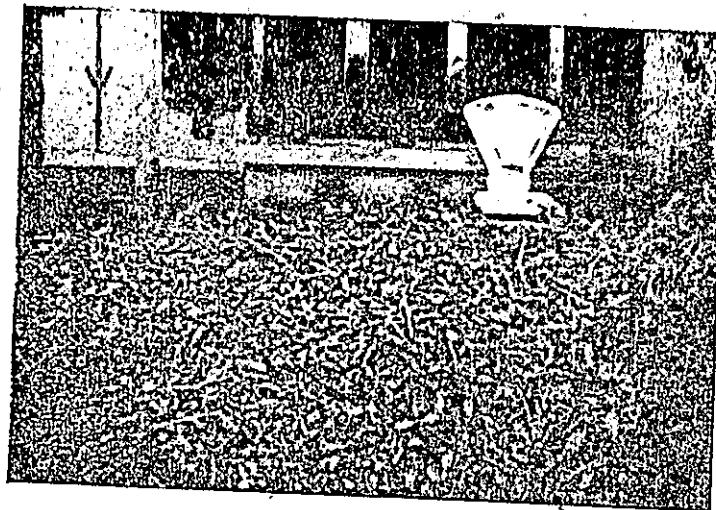


Fig. 2

Forraje en el laboratorio dispuesto para cargar los microsilos.

Otro aspecto, inédito a nuestra información, consistió en determinar la acción bacteriostática del metabisulfito y acetato-halogenado de glicol, ante gérmenes lácticos en condiciones de medios de cultivo y a diferentes concentraciones.

MATERIAL Y TECNICAS

Estas pruebas tuvieron lugar en el laboratorio utilizando para ello un tipo especial de microsilo.

La elección del microsilo fue nuestro primer problema. Probaron primero uno diseñado por KENNEDY (41) el cual desecharíamos después por resultar complicado, poco eficaz, y de laboriosa construcción. Sus autores lo utilizaron para estudiar el efecto de la presión sobre pequeñas muestras de forraje consiguiendo valores en éstas análogos o comparables a las de los grandes silos. Tales presiones, nos parecen en exceso artificiosas para equipararlas a las que se producen en silos a gran escala, es decir, en condiciones naturales.

Desechado este modelo hicimos pruebas con distintos tipos de recipientes clásicos utilizados para trabajos de pequeña escala en el

laboratorio (61,69): calderas de hierro galvanizado, tubos de avenamiento, recipientes de vidrio, etc.; y encontramos uno. Se trata de campanas de vidrio de las usadas para microscopios; sus dimensiones vienen a reunir las condiciones necesarias de un silo vertical en cuanto a la relación anchura-altura 1:2,5-1:3 acercándose más bien a la segunda, su capacidad de 9-10 kilos de forraje es apropiada para estimar como válidos los resultados. El microsilo que empleamos tiene 20 x 56 cm. capaz para 10 kilos de forraje, cantidad un poco menor a la teórica para ese mismo volumen en un gran silo (700 a 1.000 kg. por m³), ello obliga a valernos de sobrepeso para conseguir la exclusión del aire.

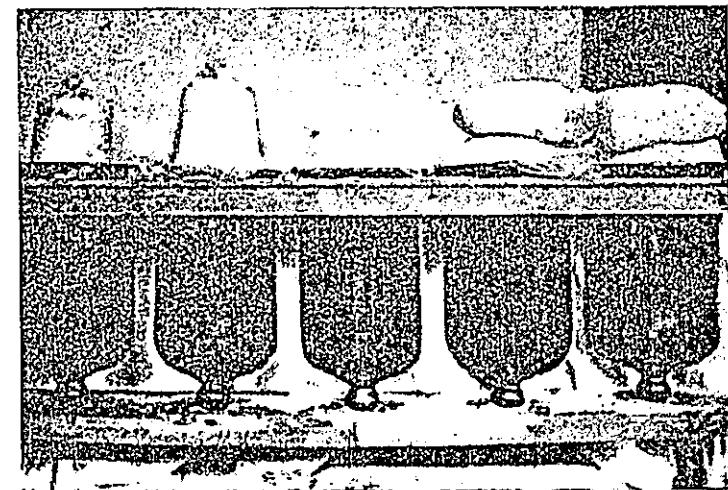


Fig. 3

Batería de microsilos utilizados en cada uno de los experimentos.

Un aspecto importante es alcanzar la compacidad necesaria para excluir el aire de la masa ensilada. Cuando se trata de recipientes muy pequeños, como son los empleados en estudios bacteriológicos, tubos de ensayos para 50 gramos de muestra, (76) la presión se consigue fácilmente.

PERKINS y PRAT (61) estudian las sobrepresiones en microsilos y concluyen, coincidiendo con otros autores, que cada silo y forraje crea unas condiciones, y que la única presión exigida es aquella capaz de expulsar el aire totalmente de la masa forrajera ensilada, opinión

que compartimos nosotros. BUELEN (14) hace el vacío en silos verticales consiguiendo resultados favorables. En la primera prueba nosotros colocamos 10 kg. de sobrepeso y 20 en las siguientes. La presión se daba con bolsas de arena situadas sobre un disco de madera que se utilizaba para cubrir el silo. Los 20 kg. dieron resultados más satisfactorios lo cual se podía apreciar por el mejor estado de la capa superficial.

La alfalfa en cada prueba procedía de diferentes períodos de desarrollo, iniciación de los botones florales, comienzo de floración y corte otoñal. En los tres experimentos se dejó expuesta al sol de 4-5 horas, lo cual representaba una humedad de 69-70 por ciento en el momento de llevarla al silo. En las dos primeras pruebas se ensiló entera y en la tercera troceada.

Los conservadores elegidos fueron el metabisulfito sódico y el acetato-halogenado de glicol. El primero tiene un prestigio ganado en el terreno práctico y experimental, razón por la cual nos interesa probarle en España, de donde no tenemos noticias de su uso. El acetato-halogenado de glicol, es un producto ya comercializado pero con muy pocos antecedentes críticos de valor sobre su empleo.

Los inóculos lácticos, integrados por los gérmenes anteriormente citados, son otra de las variantes.

Como acondicionador hidrocarbonado, ensayamos las melazas; este aditivo se ha utilizado a dosis muy variables. Lo que sí es normal es diluirlo en la proporción de dos partes de melazas en una de agua. Nosotros utilizamos 12,5 kilogramos por Tm. de forraje, es decir, 125 gramos para los diez kilos de alfalfa disueltos en 50 c. c. de agua.

TECNICAS

En cada una de las pruebas se tomaron muestras en el mismo momento de llegar el forraje al laboratorio para determinar el contenido de humedad, pH y ácido láctico; otra porción se desecaba al calor de una lámpara de infrarrojos (sin pasar de 70°) y molida en un "turmix" se conservaba en un frasco de cierre hermético para sobre ella determinar: cenizas, proteína bruta, fibra bruta, extracto etéreo, calcio, fósforo y magnesio.

Al abrir los silos, después del período de conservación, se comenzaba haciendo una valoración del producto por sus caracteres organolépticos, datos muy significativos y de fundamental importancia para apreciar la calidad del ensilado. A continuación detallamos el standard internacional aceptado para este criterio.

COLOR excelente: verde natural o ligeramente amarillo.

Aceptable: Verde oscuro, moreno o muy amarillo.

Indeseable: verde negro, muy moreno (indicando sobrecalentamiento o putrefacción), blanco grisáceo (exceso de mohos).

OLOR excelente: Olor agradable, sin apreciar olores butíricos o de putrefacción.

Aceptable: No tan limpio de olores anormales, algo mohoso o quemado.

Indeseable: Olor pútrido, butírico o mohoso.

SAPIDEZ O APETICIBILIDAD: Se aprecia ofreciendo algunas muestras a animales que aceptaban los buenos y necesitaban acostumbrarse a los de mediana calidad. (16, 17, 18, 65).

En algunos países con el fin de estimular a los agricultores se organizan concursos. Cada participante presenta un silo y un jurado de técnicos califica con estos módulos ajustados a una puntuación (23).

La "Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft DIG" ha desarrollado recientemente un sistema para determinar la calidad de los ensilados basado en la apreciación del olor, de la textura y del color (30).

Las determinaciones fueron hechas siguiendo las técnicas siguientes:

Sustancia seca: Se determinó desecando en estufa a 103-105° C. hasta peso constante.

Proteína bruta: (N x 6,25) Se siguió la técnica de KJELDAHL, utilizando selenio como catalizador.

Fibra bruta: Métodos de WEENDE con las particularidades de la técnica descrita por GALVEZ (28).

Extracto etéreo: Extracción con el aparato de Soxhlet, mediante éter sulfúrico 65°.

Cenizas: Incineración hasta combustión total en mechero de gas primero, y en horno de mufla, después.

Materias extractivas libres de nitrógeno: Se obtienen por diferencia deduciendo de la materia seca las anteriores determinaciones.

Calcio: El precipitado de oxalato cálcico obtenido por medio de oxalato amónico, se valoraba por determinación permanganimétrica.

Fósforo: La técnica seguida por LEPER (46) por precipitación con molibdato amónico.

Magnesio: La técnica descrita por KOLTHOFF y SANDELL (43).

Ácido láctico: La técnica de FRIEDMAN y GRAEZER (27) de oxidación de ácido láctico para liberar el acetaldehido y modificada por SMITH, (73). El aparato especial que se requiere para su ejecución se construyó ex profeso.

pH: Utilizamos un potenciómetro BECKMAN de electrodos de vidrio.

Este conjunto de técnicas son consideradas suficientes para valorar y estudiar el ensilado según los participantes en la segunda conferencia de ensilado celebrada en Beltsville durante el mes de marzo de 1959 (79).

El material y técnicas de que nos servimos para el estudio del poder bacteriostático del metabisulfito sódico y acetato-halogenado de glicol frente a los gérmenes lácticos, así como el proceder seguido con las muestras de forraje ensilado destinadas a determinación directa de su flora microbiana serán descritos con detalle en el capítulo correspondiente.

PRIMER EXPERIMENTO

Duración: 30 días.

La alfalfa fue segada cuando se iniciaba la aparición de los botones florales. La siega tuvo lugar a las diez de la mañana y se dejó expuesta al sol durante cuatro horas. Transportada al laboratorio se determinaron inmediatamente humedad y pH. Se necesitaron nueve kilos de forraje sin fragmentar para cada microsilo. La compacidad necesaria en cada uno se dió a mano, procurando el máximo apelmazamiento. Bolsas de arena con 10 kilos sirvieron de sobre peso, desapareciendo con ellas un ligero calentamiento que se iniciaba en la parte superior del microsilo; la temperatura se midió a través del orificio de drenaje en algunas fases de la prueba y en ninguna excedió los 22° C. En una batería de 5 microsilos se utilizaron los siguientes tratamientos:

Silo N.º 1. Llenado: 27-VII-59.

Conservador: Método A. I. V. con ClH 2N siguiendo el proceder de la Estación Experimental de Prácticatura de Lodi (Italia) (78) para el cálculo de la cantidad necesaria de ácido. Consiste en triturar una porción del forraje que se pretende ensilar y se recoge con sus jugos; partes alícuotas de este triturado son puestas en vasos de precipitado con agua destilada para facilitar una mezcla homogénea. Estas reciben cantidades distintas del ClH 2N que oscilan en un número fijo c.c. des-

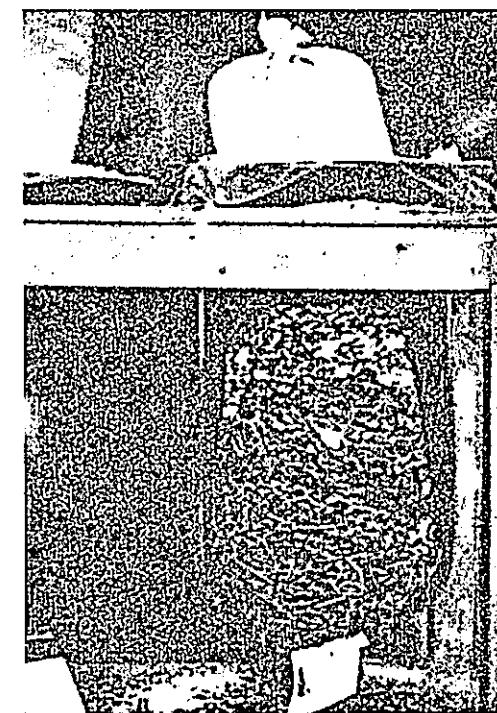


Fig. 4

Microsilo roto durante uno de los experimentos.

pués de 24 horas en maceración se determina el pH en cada muestra. Los c.c. del ClH 2N y los valores de pH que a cada uno de ellos corresponde se llevan a un sistema de coordenadas disponiendo en las abscisas las cantidades del ácido añadidas y en las ordenadas el pH que dieron. Se unen los puntos gráficos correspondientes con una línea recta

y por ella podemos determinar el número de c. c. de ácido necesario para conseguir el pH que deseamos. En nuestro caso, para obtener un pH 3,5 necesitamos 30 c.c. ClH 2N por kilogramo de forraje. Se distribuyó por toda la masa pero agregando mayor cantidad de ácido en la porción superior, como se hace normalmente en la práctica para evitar el acúmulo excesivo de líquido conservador en las capas inferiores.

Abierto: 27-VIII-59: Al descubrir el silo la capa de forraje inmediata a la cubierta tenía un veteado mohoso, y también los primeros centímetros tenían un aspecto alterado, sólo el tercio inferior que había mantenido suficiente contacto con el líquido acidificante mostraba las características de un buen ensilado. En el fondo del microsilo se recogió medio litro de líquido, aproximadamente.

El resultado no fue satisfactorio por la mucha cantidad de forraje estropeado, es bien sabido y tuvimos ocasión de comprobarlo, que las formas de silo-vertical no resultan para este sistema. No obstante de la parte salvada recogimos muestras para análisis.

Silo número 2. Llenado: 27-VII-59.

Conservador: Metabisulfito sódico en la proporción de seis gramos por kilo de forraje. La cantidad total a distribuir se introdujo en un recipiente con tapa agujereada para espolvorear uniformemente cada capa de carga. El cierre se realizó colocando una cubierta de plástico, un disco de madera y 10 kilos de peso. La exclusión de aire fue satisfactoria. Se abrió el drenaje durante la fermentación y no hubo salida apreciable de fluentes.

Abierto: 28-VIII-59. La parte superficial estaba muy estropeada, después continuando el descargue se percibía un olor aceptable, color aceituna.

Silo número 3. Llenado, 27-VII-59

Conservador: Acetato-halogenado de glicol en la proporción de 0,13 gr. en 45 cc. de agua por cada kilo de forraje. Por aplicarse en solución acuosa procuró recargarse la adición en las capas superiores de carga. Se cerró como el anterior. Se abrió el drenaje a las 24 horas y salieron algunos líquidos.

Abierto: 29-VIII-59. La parte superficial más estropeada que en el anterior. El resto del forraje en el marco de una fermentación láctica no ofrecía tan buenas cualidades como con el metabisulfito sódico.

Silo número 4

Este silo presentaba un buen aspecto hasta el décimo día de conservación (foto número 4) fecha en la que se rompió el recipiente sin causa aparente, posiblemente por un defecto del vidrio. Se había usado metabisulfito sódico con melazas como conservador.

Silo número 5

Actuó como testigo. Fue cargado y cerrado igual que los anteriores. No se utilizó conservador, ni aditivos hidrocarbonados, el resultado fue una putrefacción general en la mitad superior del silo y un intenso olor butírico, en la inferior.

SEGUNDO EXPERIMENTO

Duración 30 días

La alfalfa procedía del mismo cultivo que la anterior, y fue cortada cuando se encontraba en floración. Despues de segada estuvo cuatro horas al sol. Se llenaron los cinco microsilos, con nueve kilos de forraje, sin trocear, alcanzando todos el final de la prueba. Las muestras se tomaron en la forma descrita anteriormente.

Se ensayaron el metabisulfito a menor concentración, acompañándolo de inóculos lácticos o melazas, también el acetato-halogenado de glicol con inóculos lácticos y melazas. Se prescindió definitivamente del ensilado con ácidos minerales, en parte por no ser estos recipientes los más adecuados a su uso y sobre todo por que está siendo sustituido por otros conservadores que le aventajan en economía y facilidad de empleo con igual seguridad. En algunos microsilos se colocó doble sobre peso que en las pruebas precedentes. Se hicieron siembras a partir de muestras de forrajes ensilados, por dilución en agar lactosado-azul china para identificación directa por microscopio de las colonias.

Silo número 1. Llenado 3-IX-59

Conservador: Metabisulfito cuatro gramos por kilo de forraje y 100 cc. de cada inóculo de lácticos (*Strep. lactis* y el *Lact. plantarum*). El inóculo (véase en las pruebas de bacteriostasis la procedencia de estos gérmenes) se obtuvo suspendiendo en cinco cc. de suero fisiológico un cultivo de los gérmenes creciendo sobre agar Tween 80 llevado a un volumen final de 100 cc. Verificado el recuento por el método de BREED,

dió una concentración de 65 millones por cc., la suspensión de *Strep. lactis* y de 90 millones por cc. el *Lact. plantarum*. El metabisulfito se agregó proporcionalmente con cada carga de forraje. Diez kilos de sobrepeso.

Abierto 3-X-59: La parte superior bastante afectada. La actuación de los gérmenes lácticos, en un forraje sin trocear, pobre en hidratos de carbono, sin adición de éstos en alguna otra forma, dió un producto de color verde aceituna pálido, con franjas amarillentas. Su olor indicaba que la proteolisis, sin ser alarmante, se había insinuado. Su pH de 5,5 y bajo tenor de ácido láctico, 0,5 por ciento, lo indican claramente. Se concluye que los gérmenes lácticos tratándose de leguminosas sin trocear, y sin ningún aditivo hidrocarbonado, no son eficientes.

Calificamos el producto de este ensilado de baja calidad.

Silo número 2. Llenados 3-IX-59

Conservador: Metabisulfito sódico: cuatro gr. por kg. de forraje y un inóculo láctico hetero-fermentativo. Los gérmenes fueron el *Lact. brevis* y *Leuconostoc mesenteroides*, usando 10 cc. de cada. Como sobre-peso diez kilos.

Abierto: 1-X-59. Fue de baja calidad. A las desventajas ya señaladas se unía la de tratarse de inóculos de heterolácticos. El olor, sin ser excesivo, recordaba la presencia de ácido butírico.

Por primera vez se tomó una muestra, con material estéril, del forraje ensilado troceándola en un vaso de precipitado; el forraje cortado se cubrió con suero fisiológico y se dejó en maceración una noche en ambiente de laboratorio. Del líquido de esta suspensión hicimos varias preparaciones, teñimos por el Gram y apareció una flora dominante de los gérmenes inoculados, algún esporulado y otros. A partir de la suspensión madre, hicimos soluciones 1/100, 1/1.000, 1/10.000 para sembrar en agar-lactosado-azul china, incubando a 22-28° C. Las colonias que en medio incoloro al azul china, viraron su contorno, se picaron y observaron al microscopio previa tinción por el Gram (modificación para la técnica standard norteamericana de análisis de agua). Esta observación sólo tiene valor cuando se hace entre las 18-24 horas de cultivo.

Silo número 3. Llenado 3-IX-59

Conservador: Metabisulfito sódico, cuatro gramos por kilo de forraje, junto con 125 de melazas diluidas en 50 cc. de agua e inóculos

lácticos a base de *Lact. plantarum* y *Strep. lactis*, 10 cc. de cada uno. La concentración fue de 30 y 40 millones de gérmenes por cc. respectivamente; para obtener esta concentración casi, la mitad más baja que las anteriores, se diluyó la suspensión inicial.

En esta prueba se intenta dirigir la fermentación con la ayuda de melazas para que obligadamente sea láctica. Al no estar troceada la cosecha, con esta cantidad de metabisulfito es menos segura la conservación. El sobrepeso fue de 20 kilos.

Abierto: 5-X-59. La capa superficial tenía menos espesor alterado que en las otras pruebas. El ensilado del forraje exhibía unas características que le hicieron a simple vista de calidad aceptable. Olor agradable, color verde. Los valores de pH, 4,6 y de ácido láctico, dos por ciento, lo confirmaron. El examen bacteriológico, efectuado como se describió, ofrecía una flora que estaba preferentemente representada por los gérmenes del inóculo.

Silo número 4. Llenado: 3-IX-59

Conservador: Acetato-halogenado de glicol, 0,13 gr. en 45 cc. de agua por kilo de forraje, melazas 125 gr., diluidas en 50 cc. de agua. El inóculo *Lact. plantarum* y *Strep. lactis*, en la misma concentración y cantidad que en el silo número 3. Veinte kilos de sobrepeso.

Abierto: 6-X-59. La capa superficial, más estropeada, color verde más claro que el anterior. Olor ligeramente acético. Fue simplemente bueno. El conservador responde bien pero parece no limitar tan enérgicamente como el metabisulfito algunas fases de la fermentación. En los análisis bacteriológicos predominó la flora láctica inoculada.

Silo número 5. Llenado: 3-IX-59

Conservadores: Melazas y un inóculo de lácticos en cantidades, y concentraciones, similares a los anteriores. Prescindimos de ambos bacteriostáticos en este silo.

Abiertos: 7-X-59. Este, como los precedentes, con veinte kilos de sobrepeso, presentaba menos pérdidas en superficie. El producto tenía aspecto de haber sufrido una fuerte fermentación. Color verde-amarillento. Olor un poco fuerte. El valor del pH fue cuatro y el ácido láctico tres por ciento que pueden considerarse como francamente buenos. Esta fermentación tan intensa aunque sea láctica, resulta contraproducente. La causa puede estar en el exceso de azúcares de que dis-

ponen los gérmenes lácticos y la falta de control bacteriostático que desencadenan una fermentación excesiva. Aunque se admite que la formación de ácido láctico detiene, al llegar a una cierta concentración, el metabolismo de los propios gérmenes que lo originaron, tal cifra parece que tiene unos márgenes de actuación muy amplios.

TERCER EXPERIMENTO

Duración: 30 días

La alfalfa utilizada en este experimento procedía del corte de otoño, completándose así el ciclo de este cultivo. Contando con peores condiciones atmosféricas se hizo coincidir la siega con un día soleado para llevar el contenido de humedad a un 71 por ciento.

Nuestro principal objetivo en este experimento consiste en comprobar si el troceado del forraje sustituye con éxito el empleo de melazas, estando presente alguno de los conservadores y observar cómo repercute este tratamiento previo sobre las demás variantes. Todos los silos recibieron la alfalfa cortada en trozos de 10-12 cms.

La prueba se realiza en un momento del cultivo de esta leguminosa poco apropiada para ensilar, por ello los resultados serán de más valor.

En todos los silos se utilizaron 20 likos de sobre peso.

Silo número 1. Llenado: 20-X-59

Conservador: Metabisulfito sódico, seis gramos por kilo de forraje, espolvoreando cada carga del silo. Con el forraje en estas condiciones fue mucho más fácil llenar el microsilo y se logró con menos esfuerzo una mayor compacidad lo que se reflejó en que tuvo cabida para un kilo más de forraje.

Abierto: 20-XI-59. Una capa de 3-4 cm. contaminada de mohos. Olor aceptable. Color verde ligeramente desvanecido. Se hizo la primera prueba de apetecibilidad ofreciendo una porción a una vaca que la aceptó inmediatamente, lo cual es importante ya que los animales necesitan unos días para adaptarse al consumo de los forrajes ensilados (18, 19, 64). Este ensilado por su color, olor, prueba de sapidez, pH, (4,8) y contenido en ácido láctico (uno por ciento) puede considerarse de buena calidad. Efectuamos, según técnica descrita, alguna preparación microscópica y cultivos, encontrando algunas formas bacilares y cocos Gram positivos.

Silo número 2. Llenado: 20-X-59

Conservador: Metabisulfito a la dosis de 6 gramos por Kg. de forraje y un inóculo de *Strep. lactis* y *Lact. plantarum* en la cantidad de 10 c. c. de una suspensión de cada uno de estos gérmenes con una concentración de 40 y 55 millones cc. respectivamente.

Abierto: 21-XI-59. Al abrir este microsilo el forraje era de excelente calidad. El valor del pH 4,5 y ácido láctico, 1,7 por ciento son muy elocuentes. Sólo una película de unos dos centímetros aparecía deteriorada en superficie. Color verde casi natural y olor excelente.

Silo número 3. Llenado: 20-X-59

Conservador: Metabisulfito a la dosis de seis gramos por kilo. Melazas 125 gramos en 50 cc. de agua y un inóculo de *Strep. lactis* y *Lact. plantarum*, en cantidades y concentraciones como en el anterior.

Abierto: 22-XI-59. Junto a un valor de pH muy bajo, cuatro, una tasa en ácido láctico del tres por ciento el forraje ofrecía un olor fuerte, algo cargado y un color verde-amarillento. Tuvimos ocasión de comprobar que el empleo de melazas con inóculos, aún con conservador, y tratándose además, como en esta ocasión de un forraje troceado, desborda la tutela reguladora del bacteriostático. Fue de calidad inferior al menos en su aspecto, al anterior, aunque la composición es semejante. En definitiva que los forrajes troceados, aún tratándose de leguminosas, estando presente el metabisulfito, no es conveniente el empleo de melazas, máxime si con el conservador se agrega un inóculo de lácticos.

Silo número 4. Llenado: 20-X-59

Conservador: Acetato-halogenado de glicol, 0,13 gramos en 45 cc. de agua por kilo de forraje. Se cuidó, como es obligado tratándose de un bacteriostático que se agrega en solución acuosa, verterlo sobre las capas últimas de carga en mayor proporción.

Abierto: 23-XI-59. Las pérdidas superficiales fueron mayores que con el metabisulfito en idénticas condiciones. La calidad de la masa ensilada fue bastante buena. Color y olor aceptables. La prueba de apetecibilidad resultó positiva. A este conservador le favorece más el troceado del forraje que al metabisulfito a juzgar por lo mucho que mejoraron sus resultados en este experimento.

Silo número 5. Llenado: 20.X.59.

Conservador: Acetato-halogenado de glicol y un inóculo de *Strep. lactis* y *Lact. plantarum* en las proporciones anteriormente citadas.

Abierto: 24-XI-59. Olor un poco más fuerte que sin el inóculo sin dejar de ser bastante aceptable. Color verde que recordaba en parte al forraje fresco, más que el anterior. Como en el caso del metabisulfito (Silo número 2) se confirmó que la adición de inóculos al forraje tratado con estos bacteriostáticos asegura más firmemente la conservación y no deteriora el producto ni en su aspecto ni en su composición nutritiva.

El producto conseguido fue, junto con el del silo número 2 de este experimento, de excelente calidad, aunque ligeramente superior en aquél.

Los resultados obtenidos en las determinaciones realizadas en todos los experimentos se resumen en la Tabla I.

Composición química del fúrtajo fresco y ensilado con el efecto de distintos conservadores

TABLA 1.

Porcentaje de materia prima	EXPERIMENTO N.º 1					EXPERIMENTO N.º 2					EXPERIMENTO N.º 3					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Humedad %																
9,5	10,5	11	—	—	71	69	70	72	72,5	72	70	69	71	72	71	
Cenizas %	—	—	9	10	10,5	10,5	10,5	10,8	11	8	9,6	9,8	10	9,8	10	8,5
Proteína bruta %	20	20	19	—	—	22	35,5	36	17,5	17	17	22	22,7	21,5	22	25
Fibra bruta %	29	28	29,5	—	—	22	35,5	36	36	37	36,5	20	24,5	24,6	26,2	25,3
Extracel. etíereo %	4	4,8	4,6	—	—	4	3,9	3,8	4	4	3,5	4	4,1	4,3	4	3,8
Fibra cel. libres nitroge.	37,5	36,7	35,9	—	—	39	32,6	32,2	32,1	31,2	31,5	37,5	39	38,8	38	38,3
Acido láctico %	0,8	0,7	0,5	—	—	—	0,5	0,5	2,0	2,5	3,0	—	1	1,7	3	0,8
Por mil de sustancia seca:																—
Calcio (CaO)	10	15,7	15	—	16	16	14	13,5	13,6	13,5	13,2	13	14,3	14,1	14	14,3
Fórtoro (P ₂ O ₅)	3,9	4,6	4,4	—	—	4,7	4	3,7	3,5	3,8	3,7	3,5	4,3	4,4	4,2	4,3
Magnesio (MgO)	2,5	3,6	3,3	—	—	3,7	3,6	3,7	3,7	3,7	3,5	3,6	3,5	3,4	3,6	3,6
Acides (pH)	4,2	5,2	5,3	—	—	6,3	5,5	5,6	4,6	4,4	4,0	6,1	4,8	4,5	4	4,7

PRUEBAS BACTERIOSTATICAS *

Las concentraciones que se vienen empleando como más adecuadas de los bacteriostáticos se han elegido por los resultados que su aplicación, a diferentes dosis, proporcionaron en la práctica.

El éxito de estos conservadores, para mantener el forraje en buenas condiciones en ensilado, nos ha inducido a estudiar su poder bacteriostático hacia los gérmenes lácticos en medio de cultivo.

El grupo de gérmenes lácticos que hemos utilizado para estudiar el efecto de estos bacteriostáticos en el laboratorio está representado por el *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*, pedidos a la "American type culture collection" y recibidos en cultivo liofilizado con los números de registro: 4.008, 4.006, 7.973 y 8.293, respectivamente. Para pasar de liofilizado a cultivo ordinario se probaron varios medios especiales de lácticos decidiéndonos por el de ROGOSA (69) medio que también cita KEDDIE (39), lleva Tween 80, como portador de ácido oléico, factor estimulante del crecimiento para los gérmenes lácticos. A este medio se le da carácter tampón para que al mantener un pH determinado inhiba el crecimiento de otros gérmenes si se trabaja con muestras contaminadas. Este medio está formado por: extracto de levadura 0,75 gr.; peptona, 0,75 gr.; glucosa, un gr.; fosfato monopotásico, 0,2 gr.; jugo de tomate, 10 c.c. Tween 80 c.c.; agar, 1,5 gr.; agua, 100 c.c., pH 6.

Del liofilizado de cada germen hicimos siembra en superficie y picadura en medio sólido y líquido. Incubamos a 30° C los lactobacilos, a 25° C el *Leuconostoc mesenteroides* y 37° C el *Strep. lactis*. Estos gérmenes pueden crecer, y así se multiplican en su habitat natural, dentro de temperaturas muy variables. Su proliferación en el silo a 20-22° C es demostrativa. Incubamos no obstante a las citadas temperaturas porque las señala como óptimas BERGEY (8).

Las concentraciones a emplear de estos conservadores formaron una serie, cuya media correspondía a las cantidades ordinariamente usadas en la práctica del ensilado. Los bacteriostáticos estudiados actúan sobre el medio provocando modificaciones antagónicas al desenvolvimiento de una flora estrictamente aerobia condición a la que no están

* Estas pruebas fueron realizadas en el laboratorio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de León.

sujetos ninguno de los gérmenes ensayados, considerados microaerófilos por sus requerimientos de oxígeno según BERGEY (8).

Antes de usar estos productos hicimos una prueba de esterilidad que resultó negativa. Las cantidades de metabisulfito probadas permitieron hacer pesadas y como tal se agregaron. Para el acetato-halogenado de glicol con el que se trabaja en cantidades muy pequeñas partimos de soluciones madres. (Tabla 2.* y 3.*).

TABLA 2.*

Concentración de metabisulfito sódico en las pruebas de bacteriostasis

Cantidad del producto en el silo %	En 10 c. c. de Agar-Tween 80.
1	0,01
5	0,05
10	0,1
20	0,2

Esta prueba se realizó dos veces y al encontrar resultados paralelos no se repitió.

Describimos a continuación la marcha seguida: en baño maría a 45° C se mantiene el agar previamente fundido, se siembran los gérmenes, se añade el bacteriostático. Una gradilla con 16 tubos conteniendo 10 c.c. de medio se utilizaron para el metabisulfito. Ocho de ellos recibieron dos c.c. de agua destilada estéril en compensación a la mayor cantidad de producto sólido que recibían. Para el acetato-halogenado de glicol 24 tubos, a 10 c.c. los cuatro que recibían 0,5 c.c. de solución madre se concentraron un poco.

Cultivos en superficie de los cuatro gérmenes del ensayo, suspendidos en solución salina, sirvieron para la siembra, utilizando 0,01 c.c. en cada una de ellas.

Sembrados los tubos y agregado el bacteriostático a la concentración correspondiente y gradual para cada germen, bien sólido, como en el caso del metabisulfito; o a partir de soluciones madres, para el acetato-halogenado de glicol, se agitaron por rotación, se tendieron y una vez enfriados se incubaron a 37° C el *Strep. lactis*, 28° C el *Lact. plantarum* y *Lact. brevis* y a 23° C el *Leuconostoc mesenteroides*. Trans-

curridos cuatro días de incubación se trituró y homogenizó el contenido de cada tubo en un "Turmix", con 10 c.c. de suero fisiológico y a partir de estas suspensiones, inmediatamente de detener el "Turmix", para evitar sedimentación, cargábamos con pipeta centesimal y hacíamos conteo por muestra doble siguiendo el método de BREED. Tinción por el Gram la modificación con las técnicas estandar norteamericanas de análisis de agua. Ninguno de los cultivos apareció contaminado a la observación microscópica durante el recuento.

TABLA 3.*

Concentración del acetato-halogenado de glicol en las pruebas de bacteriostasis

Cantidad de producto en el silo %	En 10 c. c. de Agar-Tween	Soluciones madre S. M.	Cantidad en c. c. a agregar en el medio, de S.M.
0,05	0,0005	1 %	0,05
0,1	0,001	1 %	0,1
0,15	0,0015	1 %	0,15
0,2	0,002	1 %	0,2
0,5	0,005	1/50	0,25
1	0,01	1/50	0,5

En las tables 3.* y 4.* se indican las concentraciones y técnica seguida para prepararlas, con ambos bacteriostáticos.

TABLA 4.*

Resultados del conteo efectuado para cada germen y concentración en las pruebas de bacteriostasis

Metabisulfito por 1.000	1	5	10	20	Testigos	
Núm. de gémenes por c.c. en millones.						
<i>Lact. plantarum</i>	50	20	3	1	80	
<i>Lact. brevis</i>	43	18	2,5	0,5	75	
<i>Strep. lactis</i>	40	16	2	1	90	
<i>Leuc. mesent.</i>	30	10	1,5	0,5	68	

El metabisulfito, tabla 5, a la concentración más baja provoca un descenso del 37,5 al 42 por ciento con relación a las cifras de los tubos testigos en los lactobacilos y del 55-56 por ciento en los cocos. Con las dosis de uso corriente en la práctica la inhibición se sitúa entre el 75-76 por ciento para los lactobacilos y del 82-85 por ciento para los cocos; detalles que debemos de tener en cuenta ya que los cocos parecen ser más inhibidos, lo que da más importancia al bacteriostático pues estas formas se desarrollan inicialmente y no es bueno que lo hagan hasta el extremo de que perjudiquen el ulterior desarrollo de los bacilos lácticos.

La proliferación de estos gémenes en el silo es posiblemente algo más intensa, con las mismas dosis de conservadores. Es frecuente advertir, en los ensilados con este bacteriostático, que el producto no presenta señales de haber experimentado una fermentación excesiva. Entre el 10-20 por ciento el crecimiento es pobrísimo, cifras que no se emplean en la práctica, por otra parte usado en estas proporciones se ha asociado su participación en intoxicaciones ocurridas en el ganado lechero que fue alimentado con ensilados conservados por el metabisulfito a dosis elevadas. LUEDKE, BRATZLER y col. (47) han estudiado detenidamente estas cuestiones haciendo ingerir a vacas lecheras diversas cantidades del producto puro llegando a la convicción de que a dosis de 5-7 kilos por tonelada de forraje resulta totalmente inocuo. Nuestra dosis experimental, seis gramos por kilo de forraje, permite una fermentación que sin resultar excesiva conserva bien el forraje y no ocasiona trastornos en los animales.

TABLA 5.*

Resultados del conteo efectuado para cada germen y concentración en las pruebas de bacteriostasis

	Concentración de acetato-halogenado de glicol por 1.000						Testigo
	0,05	0,1	0,15	0,2	0,5	1	
Número de gémenes por c.c. en millones							
<i>Lact. plantarum</i> ...	65	50	40	25	5	2	80
<i>Lact. brevis</i>	57	43	35	17	3,5	2,5	75
<i>Strep. lactis</i>	40	30	27	10	2,5	1	90
<i>Leuc. mesent.</i>	31	17	12	7	3	1,5	68

El acetato-halogenado de glicol a las concentraciones usuales de la práctica tolera una proliferación más abundante que el metabisulfito y se manifiesta en el estado del producto ensilado, que demuestra haber sufrido una fermentación más intensa con acetato-halogenado de glicol. Sería interesante ensayar este producto, a dosis más altas entre 0,15-0,5 comprobando al mismo tiempo, el efecto que pudiera tener sobre los animales. Este bacteriostático inhibe del 44-52 por ciento el crecimiento de los lactobacilos y el 60-67 por ciento de los cocos, nos estamos refiriendo a resultados obtenidos con el bacteriostático utilizado a la dosis de uso más frecuente en la práctica. Inhibe, como el metabisulfito, más intensamente el desarrollo de las formas cocáceas.

Es evidente que el metabisulfito a las dosis que normalmente se emplea para ensilar tiene una acción bacteriostática más fuerte que el otro conservador. El fin del ensilado es mantener el forraje con el mínimo de pérdidas y la fermentación láctica no es provocada para modificar el forraje sino con objeto de evitar la aparición de otras fermentaciones nocivas. Por ello es muy conveniente regular su intensidad por medio de estos bacteriostáticos los cuales con su presencia y la formación de ácido láctico protegen el forraje contra cualquier otra fermentación indeseable.

En el silo hay que tratar de instaurar una fermentación láctica pero puede defenderse y asegurarse, con el uso de bacteriostáticos.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En las pruebas realizadas se confirma una vez más que la alfalfa sola es difícil de ensilar, y que si la conservación en el silo se facilita con la adición de gramíneas, en el momento de introducir el forraje en el silo o procedentes de un cultivo mixto, no es aconsejable ensilarla íntegra, queremos decir, sin trocear.

La desecación parcial para llevar el contenido en humedad del forraje a un 69-70 por ciento beneficia la conservación y este efecto se refuerza si se trocea el forraje. MURDOCH (57) ensilando cosechas con diferente contenido en humedad encontró que si se reducía ésta se consiguen menores pérdidas en sustancias nutritivas.

Ambos tratamientos previos del forraje provocan las mejores condiciones para la implantación de una fermentación láctica, asegurán-

dose así la permanencia del ácido formado que podría, de existir mucha humedad, salir con los líquidos que fluyen del silo. Con la desecación parcial se produce una hidrolisis de los glucidos complejos que integran las paredes celulares de las plantas y que al trocear el forraje se ponen a disposición de la flora láctica junto con otros principios liberados con los jugos.

Las presiones excesivas, cuestión tan debatida, son contraproyectantes para la creación y mantenimiento de una fermentación láctica; algunos parecen olvidar que estos gérmenes, por sus exigencias en oxígeno, están clasificados como microaerófilos, y por ello si el forraje tiene un elevado contenido en humedad, el apelmazamiento puede dar lugar a la aparición de una fermentación butírica. Los forrajes muy húmedos son propensos a que sobre ellos se desarrolle el *Clostridium butyricum*, (11) pues este germen está facultado para actuar después de haberse celebrado una fermentación láctica y como la excesiva compacidad producida conduce a una lixivación se elimina del silo el ácido formado que actúa de conservador si no se marcha, cosa que sucede cuando hay abundante salida de jugos. En estas circunstancias en pleno estado de anaerobiosis, y aún con un pH bajo, pueden entrar en juego otros gérmenes nocivos para un buen ensilado.

Al comparar los mismos conservadores con forraje íntegro y troceado los resultados fueron extraordinariamente mejores con los segundos. Con el forraje íntegro el metabisulfito fue superior al acetato-halogenado de glicol.

El sobrepeso del silo es necesario cuando la cantidad de forraje ensilado no tenga masa suficiente para conseguir por si misma la completa exclusión del aire, si la tiene, una simple cubierta que proteja y apelmace la capa superficial es lo único que se requiere.

El metabisulfito sódico a la dosis de seis gramos por kilo de forraje se ha comportado como un excelente conservador de leguminosas parcialmente desecadas y troceadas, dando un ensilado de color muy parecido al natural olor agradable y un pH apropiado.

El uso de inóculos lácticos con el conservador bacteriostático prevé que la flora láctica esté mal representada cualitativamente en el forraje. El acetato-halogenado de glicol no da tan buenos resultados como el metabisulfito sódico en este caso.

El metabisulfito sódico regula más estrechamente la intensidad de la fermentación láctica, como lo demuestran las pruebas de bacterios.

tasis realizadas en medios de cultivo y el aspecto que presentaba el producto ensilado. La calidad del producto mejora aún más cuando se agregan inóculos.

Las melazas, como aditivo hidrocarbonado, dan mejores resultados cuando no se trocea el forraje y si se agrega un inóculo resulta más segura la fermentación láctica, aunque acarrea más pérdidas. El inóculo de gérmenes lácticos homofermentativos es el más indicado.

En el forraje troceado la combinación: bacteriostático, melazas e inóculo, da un ensilado de peor calidad que cuanto se utilizan bacteriostático e inóculo solamente. La incorporación de un inóculo al bacteriostático, en forrajes troceados, mejora el tratamiento.

Es necesario consignar que en el ensilado es primordial asegurar la fermentación láctica, para conservar y evitar las pérdidas en nutrientes pero advirtiendo que para ello hay que procurar no comprometer demasiado los caracteres organolépticos, importantísimos para el buen aspecto del mismo y tener la seguridad de que el forraje ensilado sea bien aceptado por los animales.

El único ensayo con el método A. I. V. nos corroboró las pérdidas en algunos elementos minerales indispensables para la salud animal, frente a la casi inmovilidad con los otros tratamientos.

Con forraje sin trocear el metabisulfito en dosis de cuatro gramos por kilo de forraje y un inóculo láctico (segundo experimento, silo número 1) dió resultados inferiores al obtenido con seis gramos y sin inóculo (primer experimento, silo número 2), está claro que el inóculo, con forrajes integros, sin otra fuente de hidratos de carbono, no reporta utilidad alguna. Lo contrario ocurrió con los cuatro gramos de metabisulfito y el inóculo agregando melazas (segundo experimento, silo número 3).

El acetato-halogenado de glicol con forraje íntegro, inóculo y melazas (segundo experimento, silo número 4), dió un ensilado de mejor calidad que cuando iba solo (primer experimento, silo número 3). En todos los casos fue inferior al metabisulfito.

Cuando se asociaron las melazas e inóculos prescindiendo de los conservadores químicos se consiguió un ensilado de mala calidad (segundo experimento, silo número 5) debido, sin duda, a producirse una actividad demasiado intensa de los gérmenes provocada por la presencia de las melazas sin bacteriostático alguno.

Ensilando el forraje troceado, con seis gramos de metabisulfito (tercer experimento, silo número 1) el producto recordaba poco el obtenido con la misma cantidad de bacteriostático con forraje sin fragmentar (primer experimento silo número 2). Esta misma cantidad se mantuvo en el resto de las combinaciones de esta prueba, ya que ha demostrado ejercer un control aceptable de la fermentación. Cuando se asoció con el inóculo de lácticos (tercer experimento, silo número 2), sus resultados fueron buenos obteniendo un producto de buena calidad. Si además se añadian melazas (tercer experimento, silo número 3) disminuía algo la calidad del ensilado, pues el bacteriostático, ante un pábulo tan adecuado para los gérmenes lácticos, no mantenía la fermentación en los límites más adecuados.

El acetato-halogenado de glicol, en este tercer experimento usado sólo y con adición de inóculos (silos números 4 y 5) no desmerecería en su calidad, aunque no llegó a igualar al metabisulfito en las mismas condiciones (experimento tercero, silo número 1 y 2). No obstante recalcamos que fue mejor con inóculo que sin él.

La diferencia que se apunta en el contenido de proteína bruta entre el forraje verde y ensilado se debe a las formas volátiles. La determinación parcial de estos componentes, amidas, amoníaco, etc., orienta sobre los agentes que actuaron en la molécula proteína. MABBET (48) achaca la proteolisis a los enzimas vegetales (11), otros la atribuyen principalmente a los enzimas microbianos. Nosotros pensamos más bien que en la primera fase de la conservación cuando las células vegetales aún disponen de oxígeno sus enzimas proteolíticos no pueden estar paralizados y ya el silo en pleno dominio bacteriológico se completa la proteolisis. La formación de indol y escatol de que hablan algunos autores (50) sólo es posible en un ensilado obtenido en muy malas condiciones.

El descenso en el contenido de proteína es más aparente que real. Nosotros hacemos la determinación partiendo de una muestra seca y las formas volátiles de nitrógeno se han disipado durante el secado. Formas que de ser el forraje consumido inmediatamente hubieran sido ingeridas por los animales (Mc NAUCHT y SMITH, 86). En nuestro caso las pérdidas menores se produjeron cuando se trocea el forraje y de todas las variantes con forraje troceado del tercer experimento el mejor resultado correspondió al metabisulfito con el inóculo láctico (silo número 2) con

una pérdida alrededor del 1-2 por ciento propia de ensilados de excelente calidad (82,58).

Las variaciones en el contenido de cenizas y fibra bruta marchan paralelas con las pérdidas que se producen en los otros principios. Los forrajes de peor calidad dan cifras superiores en humedad.

La fracción extracto eléreo experimenta un incremento que sin duda se debe a los ácidos grasos formados durante el ataque de los gérmenes a otros principios carbonados, pero en nuestro trabajo no es tan manifiesto como cuando se hace la determinación sobre forraje ensilado fresco ya que durante el secado se pierden la mayor parte de los ácidos grasos volátiles.

La digestión de los carbohidratos, y en parte también de las proteínas durante la fermentación del ensilado, conduce a los mismos productos que al ser desdoblados por la microflora del rumen (22). Los últimos experimentos relativos a la importancia fisiológica de los ácidos grasos volátiles inferiores, como origen de energía y precursores de la materia grasa de la leche han aclarado la importancia cuantitativa y su influencia al estar presentes en los ensilados. El ácido butírico, cuya presencia en los ensilados como promotor de cetosis fue señalada ADLER (1), según DE VUYS son precisas cantidades superiores al dos por ciento para ofrecer peligro de cetosis. Los otros ácidos grasos que se pueden formar, láctico, acético, fórmico, propiónico, valeránico, caproico, y caprínico, no ofrecen complicaciones en la alimentación. Así el acético en raciones de ensilados con 500-600 gramos no ha provocado trastornos (22). La presencia de estos ácidos grasos eleva la digestibilidad de los forrajes ensilados ya que en la panza de los rumiantes son necesarios para facilitar la hidrolisis de la celulosa y con este fin algunos autores recomiendan la administración de melazas (49). Esta peculiaridad da mayor importancia e interés al ensilado en la alimentación de las vacas lecheras pues al ser sintetizada la materia grasa de la leche por los ácidos grasos formados en el herbario, especialmente a partir del acético, la alimentación con ensilados permite ahorrar grasas alimenticias.

Los valores de pH y ácido láctico son de gran utilidad para estimar la calidad de los ensilados. Nuestras cifras coinciden con las encontradas en otros trabajos relativos al ensilado de leguminosas (71, 37, 6, 57). Estos dos factores hay que interpretarlos de diferente modo con

las leguminosas que si se trata de gramíneas y así un pH 4,5 con 1,7 por ciento de ácido láctico (experimento tercero, silo número 2) no puede utilizarse como piloto que califique a los demás ensilados con exactitud.

Los valores de calcio, fósforo, y magnesio permanecen sin variación ostensible en la mayoría de las pruebas. Sólo en el A. I. V. (experimento primero, silo número 1) se presentaron las esperadas pérdidas en estos minerales (86,15). Estas pérdidas provocan modificaciones nefastas en el balance Ca/P que se evitan con suplementos minerales pero en una alimentación prolongada a base de ensilados obtenidos por acidificación mineral la corrección se hace cada vez más difícil. Ni la relación Ca/P, ni la alcalescencia se altera con las otras pruebas (15).

CONCLUSIONES

1.—Es momento muy apropiado, ante la actual transformación agraria, comenzar nuestra propia investigación en torno a los problemas que plantea el ensilado de los forrajes por medio de conservadores.

2.—El ensilado de alfalfa es conveniente hacerlo con el auxilio de conservadores, acondicionadores o tratamientos previos.

3.—El metabisulfito sódico en la proporción de seis kilos por tonelada de forraje, nos ofrece un ensilado en buena conservación. La predesecación, troceado del forraje y la adición de un inóculo láctico parece que mejora su condición.

4.—El metabisulfito sódico es eficaz, reduce las pérdidas en nutrientes y limita la intensidad de la fermentación láctica. Por usarse en forma sólida asegura su permanencia en el silo aún con forrajes de alto contenido en humedad.

5.—El acetato-halogenado de glicol, es otro buen conservador, pero requiere de ensayos a concentraciones más elevadas. Por emplearse en solución acuosa es menos idóneo para forrajes con mucha humedad. También se favorece su acción si se deseja previamente el forraje. El troceado y la adición de inóculos lácticos son factores positivos.

6.—La unión de bacteriostáticos y gérmenes lácticos nunca es perjudicial. El conseguir inóculos de cepas seleccionadas de gran capacidad fermentable de azúcares, facilita el ensilado de leguminosas.

7.—En la alfalfa ensilada sin trocear, la adición de inóculos resulta ineficaz sino se proporciona a los gérmenes alguna fuente de hidratos de carbono.

8.—Bacteriostáticos, inóculos de lácticos y troceado del forraje, constituyen una buena combinación. Más seguridad se consigue sumando las melazas pero se producen pérdidas mayores.

9.—El valor del pH y la riqueza en ácido láctico tienen un especial interés para interpretar el valor de los ensilados de leguminosas.

10.—En las pruebas bacteriostáticas el metabisulfito sódico reveló un poder de inhibición para los gérmenes lácticos superior al del acetato-halogenado de glicol.

RESUMEN

Se estudia la eficacia como conservadores del metabisulfito sódico y del acetato halogenado de glicol, en silos a escala de laboratorio, utilizando forraje de alfalfa.

Del trabajo se deduce que los dos son buenos conservadores de este forraje, si bien se muestra más eficaz el metabisulfito.

La conservación puede favorecerse si se deseja parcialmente el forraje, se trocea o se añaden inóculos lácticos e hidrocarbonados, manteniendo su primacía también en estas circunstancias, el metabisulfito sódico.

Se confirma en estas pruebas el gran valor que tiene el pH y el contenido en ácido láctico para determinar la calidad de los ensilados.

RESUME

On étudie l'efficacité du métabisulfite sodique et de l'acétate halogéné de glycol comme conservateurs dans des silos à échelle laboratoire, en utilisant du forrage de luzerne.

D'après le travail réalisé, on déduit que les deux sont de bons conservateurs de ce fourrage, le métabisulfite étant le plus efficace des deux. On peut aider ou favoriser la conservation du fourrage en le déssechant partiellement, en le dépieçant, ou en inoculant des germes lactiques et en ajoutant des produits hydrocarbonés, le métabisulfite sodique se montrant toujours, même dans ces circonstances, le plus efficace des deux.

On a confirmé par ces essais la grande importance du pH et du contenu en acide lactique pour déterminer la qualité des forrages mis dans des silos.

SUMMARY

A study to determine the efficacy of sodium methabisulfite and halogenated acetate of glicol as silage preservatives under laboratory conditions has been carried out.

According to the results obtained, both chemicals are useful, being more advantageous, however, sodium methabisulfite.

The preservation of forage is improved (a) partial desecation, (b) cutting it short pieces and (c) adding lactic "inoculum" and hydrocarbonate products. Under all these circumstances best results were obtained with sodium methabisulfite.

The experiment has demonstrated the value of determining pH and lactic acid contents, to judge the quality of the silage.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ADLER, J. H. 1956.—*Grass silage a possible nutritional factor in ketosis*. Cornell Veterinarian; 3.
- (2) ALLEN, L. A., WATSON, S. J., y OTROS. 1937.—*The effect of various materials and bacterial cultures*. Journal of Agricultural et des stations de recherches de Gembloux. 1 y 2.
- (3) ANTOINE, L. 1957.—*La reduction des pertes a la conservation des fourrages*. Bull de l'institutes agronomique et des stations de recherches de Gembloux. 1 y 2.
- (4) ARCHIBALD, J. G. y OTROS. 1954.—*Further observation on the composition on the grass silage*. Journal Dairy Science; 11, 1.283-1.290.
- (5) ARNAUDI, C., POLITI, I. 1946.—*Teoria e practica del ensilamiento dei foraggi*, 41 : 52. Milano Ambrosiana.
- (6) VOELKER, H. 1958.—*Preservatives for alfalfa silage*. South Dakota. Agricul. Exper. Station. Brookings. (Mimeograficado).
- (7) BALCH, C. C., y OTROS. 1955.—*The effect of chopping and lacerating before ensiling...* Journal of the British Grassland; 7.
- (8) BERGEY, D. 1957.—*Manual of determinative bacteriology*; 7 th Ed. Baltimore Wilkins Co.

- (9) BRATZLER, J. W., COWAN, R. L. 1955.—*Preservation of grass silage with sodium metabisulfite*. Agriculture Exper. Station University Park. Pennsylvania Bull; 597.
- (10) _____; y OTROS. 1956.—*Grass silage preservation with sodium metabisulfite*. Journal of Animal Science; 15.
- (11) BREIREM, K., ULVESLI, O. 1960.—*Ensiling methods*. Herbage Abstracts, 1, 1 : 8.
- (12) BROWN, W. O., SMITH, V. 1958.—*Losses in the conservation of grassland herbage as molased and metabisulfite silage in lined trench silos*. Journal Agricultural Science; 307-311.
- (13) BRYANT y BURKEY. 1956.—*The characteristics of lactate fermenting sporoforming anaerobes from silage*. Journal Bacteriology; 71.
- (15) GENNI, B., JANNELLA, G. G. 1956.—*Ricerche sull'insilamento dei foraggi verdi mediante aggiunta di acidi minerali. Modificazione del contenuto in alcuni elementi minerali nel foraggio prima e dopo della conservazione*. Annali Della Facolta di Medicina Veterinaria di Pisa; 9.
- (16) CONRAD, H. R., y OTROS. 1957.—*Milk production feed intake and digestibility following initiations of legume-grass silage feeding*. Ohio Agricul. Speriment. Station Wooster (mimeografiado).
- (17) _____; HIBBS, J. H. 1958.—*Avoid sudden changes in dairy cattle rations*. Dairy Science; october. (Mimeografiado).
- (18) _____; y OTROS 1958.—*Milk reduction may come sudden changes of dairy rations*. Ohio Farm Home research; 314.
- (19) COOPER, D. J., CORDUKES, W. E. 1958.—*A test silo and apparatus for ensiling studies*. Canadian Journal of plant Science; 38,2.
- (20) CUNNICHAN, A., SMITH, A. M. 1939.—*A motile lactobacillus isolated from A. I. V. silage*. Proceedings of the Society of Agricultural Bacteriologist. Abstracts.
- (21) _____; 1940.—*The microbiology of silage made by addition of mineral acids to crops rich in protein*. The Journal of Dairy Research; 11.
- (22) DE VUYST, A., VANDELLE, M. 1957.—*Le role des ensilages dans l'alimentation des vaches laitiers*. Agriculture Institute agronomique de l'universite de Louvain; IV, 367-390.
- (23) _____. 1957.—*Quelques propos sur un concours d'ensilage*. Agricultura. Institut Agronomique de l'Universit de Louvain. V. núm. 2, págs. 151-162.
- (24) DIRKS Citado por WATSON, S. J. 1939.—*The Science and practice of conservation...* The fertiliser feeding stuffs. Journal. I-II. 820-850.
- (25) DUFOUR, L., y OTROS. 1954.—*Sulfur dioxide as a preservative for high moisture legume silage*. Journal Dairy Science; 1, 51-77.
- (26) DIRKS. Citado por WASON, S. J. 1939.—*The Science and practice of conservation...* The fertilizer and feeding Stuffs Journal; I-II. 820-850.
- (27) FRIEDMAN y GRAEZER. 1933.—*Journal Biol Chem*; 100, 291.
- (28) GALVEZ, N. 1946.—*Curso de química para Biólogos*; 349.
- (29) GICLIOLI. Citado por LAVEZZIN, V. 1956.—*I Sili per foraggio*. 2.° Torino E. Internationale.
- (30) GONZALEZ, G. 1960.—*Bromatología y valoración de pastos*. 4.° Ponencia a la Primera reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de Pastos. Zaragoza, octubre de 1960. (Multicopiado).
- (31) GORDON, C. H., y OTROS. 1952.—*Sodium metabisulfite as silage conditioner*. Bureau of Dairy Industry U. S. D. A. (Mimeografiado).
- (32) _____; 1957.—*Some experiments in preservation of high moisture hay-crops silages*. Journal Dairy Science; 7, 789-798.
- (33) _____; 1958.—*Chemical quality and feeding value of silages stored in bunker silos*. Journal Dairy Science, 12.
- (34) _____; y OTROS. 1959.—*Nutrient losses quality and feeding value of wilted and direct cut orchard grass stored in bunker and tower silos*. Journal Dairy Science; 10, 1, 703 : 1. 711.
- (35) GROSSBARD, D., y OTROS. 1958.—*Preservation of grass for winter feeding by radiation sterilization*. Nature; 182, 321.
- (36) HALVOR PETERSEN. 1953.—*Preservación ácida del pescado y sus desechos*. Bol. de pesca de la F. A. O. 1 y 2.
- (37) IRVIN, H. M., LACGSTON, C. W. 1956.—*Development of organic acids in silage*. Dairy Husbandry research branch. U. S. D. A. Beltsville. Maryland. (Mimeografiado).
- (38) JARL. Citado por BREIREM, K. 1960.—*Ensiling methods*. Herbage. Abstracts; vol. 30, 1, 1-8.
- (39) KEDDIE. Citado 1951.—*Proceedings of society for applied bacteriology*; 14, 2.
- (40) KEMBLE. Citado en Summary of second silage conference 1959. I-II. Beltsville. Maryland.
- (41) KENNEDY, W. K. 1956.—*Laboratory equipment for silage studies*. Agron. Journal; 48, 262-264.
- (42) KNOTT, C. B. 1951.—*Sulfur dioxide preservation of forage crops*. Journal Dairy Science; 4, 329-335.
- (43) KOLTHOFF, I. M., DANELL, E. B.—*Tratado de química analítica cuantitativa*. 3.° Buenos Aires. Librería y Editorial Nijar.
- (44) KROULK, J. T., BURKEY, L. A. 1955.—*The microbial population of the green plant and the cut forage prior to ensiling*. Journal Dairy Science; 3, 256-262.
- (45) _____; y OTROS. 1955.—*Microbial activities in alfalfa and orchard grass ensiled under certain conditions in experimental silos*. Journal Dairy Science; 3, 263-271.
- (46) LETTER. Citado por CENNI, B. 1956.—*Recherche sull'insilamento dei foraggi verdi mediante aggiunta di acidi minerali*. Ann. di la Facolta di Medicina Veterinaria di Pisa; 9.

- (47) LUEDKE, A. L., BRATZLER, W. L. 1959.—*Sodium metabisulfite and sulfur dioxide grass silage preservative poisoning in cattle*. Amer. Journal Veter. Research; 20, 690-696.
- (48) MABBIT, L. A. 1950.—*The role of plant cells in the ensilage process and aproach to the problem*. School of Agriculture. Edimburg.
- (49) Mc DONALD, P., PURVES, D. 1956.—*Effects of the addition of molasses on the composition and digestibility of field silage*. Journal of the Science of food Agriculture; 3, 189-193.
- (50) Mc PHERSSON, H. T., Y OTROS. 1957.—*Changes in carbohydrate nitrogen and organic acids distribution in grass preserved with sodium metabisulfite*. Journal of the Science food Agricultural; 12, 732 : 739.
- (51) MURDOCH, J. C., Y OTROS. 1954.—*The effect of chopping lacerating on the chemical composition of silage*. National Institut for research in dairying. University of Reading.
- (52) _____; 1955.—*The use of additives in making silage*. Agricultural Review; 6.
- (53) _____; BALCH, D. A., Y OTROS. 1955.—*The ensiling of lucerne with addition of formic and glycollic acids*. Journal of the British Grassland Society; 10, 139-149.
- (54) _____; MURIEL, C., Y OTROS. 1956.—*The chemical comparison and lose of nutrients in silage made with addition of metabisulfite and halogenated acetate of glycol*. Journal British Grassland; 1, 16-22.
- (55) _____; 1957.—*Recent development in silage making in Britain*. Engineering Ressearch; 2.
- (56) _____; Y OTROS. 1958.—*The use of sodium metabisulfite in silage making*. National Institute for research in dairying. Reading.
- (57) _____; 1960.—*The effect of pre wilting herbage on the composition of silage and its intake by cows*. Journal of the British Grassland Society; 1, 70-73.
- (58) MURDOCK, F. R., Y OTROS. 1957.—*The nutrient losses and feeding value of wilted and direct-cut forages stored in tower silos*. Scientific paper. Núm. 1, 757. Washington Agric. Exper. Stat.
- (59) NASH, M. J. 1951.—*Lacerated silage*. Scot. Agric; 31, 144-147.
- (60) _____; 1959.—*Partial wilting of grass crops for silage*. Journal of the British Grassland Society; 2, 107-115.
- (61) PERKINS, A. E., PRATT, A. D. 1953.—*Densities and losses as found in laboratory silos*. Ohio. Agric. Exper. Station Wooster.
- (62) PETERSON, W. H., Y OTROS. 1958.—*Production of toxic gas (NO_2) in silage making*. Agricultural and food chemistry; 1, 121-124.
- (63) PETERSON y YRED. Citado por ALLEN, L. A. y OTROS. 1957. *The effects of various materiales and bacterials cultures...* Journal of Agricultures Science; 27.
- (64) PRATT, A. B., Y OTROS. 1958.—*Comparative palatabilities of silages*. Bull. 814. Agricultural Exper. Station Wooster Ohio.
- (65) PURVES, D. 1956. *The estimation of acetic and butyric acids in metabisulfite silage by Wiegner's distillation technique*. Chemistry and industry; 8.
- (66) REAVES, P. M. y OTROS. 1954.—*Effect of various preservative on seepage from high moisture silage*. Virginia Polytechnic Institute (mimeografiado).
- (67) REMM y WEISKE. Citados por ALLEN, L. A., y OTROS. 1937. *The effects of various materials and bacterials cultures...* Journal of Agric. Sci; 27.
- (68) ROGOSA, J. 1951.—*Journal bacteriology*; 62, 132.
- (69) ROSENBERG, R. F. 1951.—*The development of method of study of obligate anaerobes in silage*. Proceeding of the society for applied bacteriology; 2.
- (70) _____; 1956.—*The isolation and cultivation of obligate anaerobes from silage*. The Journal applied bacteriology; 1.
- (71) SAM NORDFELDT. 1955.—*The relation between pH quality of grass silages*. The annales of the royal Agric. College. of Sweeden; 22, 25-39.
- (72) SKAGGS, S. R., Y OTROS. 1952.—*Sulfur dioxide for preservation of forage*. Agric. Exp. Stat. Pennsylvania. Bull. 552.
- (73) SMITH, R. J. 1953.—*Determination of lactic acid in heavy corn streep lignon*. Anal. Chem; 25, 505.
- (74) SMITH, M. 1954.—*Seasonal variation in the quality of grass silage*. Journal of the Science of food and Agric; 1.
- (75) STALLCUP, O. 1955.—*A Comparison of silage preservatives*. Agric. Exper. Station. College of Agriculture and Home economics University of Fayetteville, Bull; 557.
- (76) STIRLING, A. 1951.—*Bacterial changes in experimental laboratory silage*. School of Agric. Edimburg.
- (77) _____; 1953.—*Lactobacilli and silage making*. Proceeding of the Society for applied bacteriology; 16, 1.
- (78) SUAREZ y SUAREZ, A.—*Datos recogidos por el autor en la Estación experimental de Lodi*. Italia.
- (79) *Summary of second silage conference*. 1959. I-II Beltevil lle. Maryland.
- (80) VIRTANEN, A. I. 1951.—*Conservación de los forrajes*. Bolet. del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas; 25.
- (81) VOELKER, H. 1959.—*Interrelationship of total losses and chemical chages in preservation of silage*. Proc. S. D. Academic Science; 39, 115-159.
- (82) WOODMAN, H. E., Y OTROS. 1926.—*Journal Agric. Science*; 16, 205-274.

- (83) WATSON, S. J. 1939.—*The Science and practice of conservation grass and forage crops*. The fertiliser and forrage crops. The Fertiliser and feeding stuffs. Journal; I-II, 820-850.
- (84) _____; 1948.—*Conservation of forage crops*. Edinburgh and East College of Agriculture. Miscell. Public; 12.
- (85) _____; 1949.—*The nutritive value of silage and dried grass*. Nutrition Abstracts and review; 18, 1-14.
- (86) _____; y OTROS. 1949.—*The chemistry of ensilage*. Chemistry and industry; 699-707.
- (87) _____; 1954.—*Recent advances in conservation of forage crops*. Journal of the Royal Agriculture Society of England; 115.
- (88) WISSEMAN, H. G., y OTROS. 1957.—*Determination of organic acids in silage*. Agric. and Food. Chemistry; 3-213.
- (89) _____; y OTROS. 1960.—*Determination of sugar in silages and forages*. Agric. and Food Chemistry; 1, 78.