

2

---

TRABAJOS CIENTÍFICOS

## PRINCIPIOS NUTRITIVOS Y FERMENTATIVOS DE ENSILADOS DE HIERBA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PRADERA Y DEL ADITIVO EMPLEADO EN SU ELABORACIÓN. PODER CONTAMINANTE DE LOS EFLUENTES GENERADOS

A.MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. ARGAMENTERÍA GUTIÉRREZ Y B. DE LA ROZA DELGADO

Departamento de Producción Animal, Pastos y Forrajes. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Apartado 13. 33300 Villaviciosa. Asturias (España).

### RESUMEN

Con el fin de analizar los principios nutritivos y fermentativos de los ensilados de hierba más frecuentemente elaborados en la Cornisa Cantábrica, el efecto contaminante de los efluentes generados y la eficacia que sobre estos parámetros muestra la adición de distintos aditivos comerciales, se elaboraron ensilados de hierba a escala de laboratorio utilizando siete forrajes: dos prados, dos praderas de *Lolium perenne-Trifolium repens* y tres cultivos forrajeros de *Lolium multiflorum*, sin aditivo o con adición de: ácido fórmico 85% (3,5 ml/kg de forraje), Morasil (melaza + propilenglicol) a 6 ml/kg, Ecosyl (bacterias lácticas) a 2ml/kg y Folia (bacterias lácticas + enzimas) a 3 ml/kg.

En cuanto al valor nutritivo y contenido energético en MJ/kg MS, todos los aditivos fueron efectivos cuando los ensilados se elaboraron con forrajes de baja ensilabilidad ( $p < 0,05$ ). El ácido fórmico destacó sobre el resto cuando el contenido en materia seca del ensilado fue inferior al 18% ( $p < 0,001$ ). En cuanto a la calidad fermentativa, todos los aditivos se manifestaron eficaces, reduciendo el pH frente al testigo sin aditivo ( $p < 0,05$ ). En términos generales, el ácido fórmico y el Morasil dieron los mejores resultados.

En cuanto al efluente generado por los diferentes ensilados, los contenidos en materia seca superiores a 250 g/kg en el forraje de partida, minimizaron o anularon la producción de efluente y por tanto la pérdida de nutrientes y poder contaminante del mismo.

Los efluentes generados por los ensilados de raigrás italiano, presentaron unos índices de DBO y DQO superiores al resto de forrajes ensayados.

Los inoculantes se mostraron efectivos para reducir los niveles de DBO y DQO en  $\text{gO}_2/\text{l}$ , pero el aditivo que incorpora enzimas en su composición aumentó el patrón de producción total de efluente, con lo cual los índices globales fueron superiores al resto.

**Palabras clave:** Composición química, calidad fermentativa, Demanda Biológica de Oxígeno, Demanda Química de Oxígeno.

## INTRODUCCIÓN

En la España húmeda, el ensilaje como técnica de conservación de los excedentes forrajeros, mucho más independiente de las condiciones atmosféricas, ha ido reemplazando progresivamente a la henificación. Así, mientras en 1984 la superficie destinada a heno y a ensilado era similar (80 000 ha), en 1994 se destinaron solamente 60 000 ha a la producción de heno frente a las 110 550 ha destinadas a la producción de ensilado, de las cuales casi un 75% correspondieron a ensilados de hierba y un 21 % a ensilados de maíz (Wilkinson *et al.*, 1996). En el caso concreto de explotaciones lecheras, a medida que aumenta la entrega de leche el ensilado se convierte en el sistema de conservación dominante, hasta el punto de constituir la base forrajera de las raciones suministradas al ganado (Argamentería *et al.*, 1997). Esta tendencia es similar a la del resto de Europa, donde un estudio realizado sobre 33 países, reveló que el 56 % de los forrajes son conservados en forma de ensilado (Wilkinson *et al.*, 1996).

En los ensilados de hierba, existe un problema generalizado de mala o insuficiente fermentación, que en ocasiones va unido a bajos contenidos en energía y proteína con muy baja ingestión voluntaria. El contenido en materia seca y otros parámetros nutritivos son muy variables. Además de otros problemas de manejo, la hierba, en general, se cosecha demasiado tarde y aparecen con frecuencia problemas de fermentación butírica.

El empleo de aditivos en el proceso de ensilaje persigue mejorar la conservación y el valor nutritivo del alimento. Alrededor de un 30% de los ensilados elaborados en nuestro país son tratados con aditivos químicos para controlar el proceso fermentativo. Los aditivos biológicos, aunque se están introduciendo con fuerza en el mercado, representan solamente un 2% (Wilkinson *et al.*, 1996).

En la mayoría de los silos se produce un drenaje natural en el que los líquidos perdidos arrastran nutrientes solubles y por tanto no disponibles para la fermentación láctica. Se trata de azúcares, compuestos nitrogenados, minerales y ácidos orgánicos producidos durante la fermentación, siendo todos estos compuestos de alto valor nutritivo y utilizables por los rumiantes e incluso monogástricos. El volumen de efluente

producido por tonelada de forraje puede oscilar desde inapreciable hasta más de 200 L (MAFF, 1976; Castle, 1982, Martínez y de la Roza, 1997). Este volumen depende de varios factores, en particular del contenido en materia seca del material de partida, la presión de compactación en el silo, los pretratamientos mecánicos, la naturaleza del forraje y el empleo de aditivos (Woolford, 1984).

El mayor problema que plantean los efluentes es el medioambiental, puesto que su evacuación incontrolada es causa de eutrofización de las aguas. Es particularmente importante en aquellas zonas cuya climatología (alta pluviometría) impide el presecado del forraje. El incremento en materia seca de una hierba a ensilar de 150 a 250 g/kg, supone una reducción en la producción de efluente de 180 a 20 L/t (Castle, 1982; Martínez y de la Roza, 1997), pero ésto en las condiciones climáticas de la Cornisa Cantábrica no siempre es posible.

En la mayor parte de los países integrantes de la UE, existe legislación sobre el control de los efluentes, restringiendo la producción u obligando la recogida en tanques especiales para los mismos. En España, el Real Decreto 261/1996, de 16 de febrero, sobre protección de las aguas contra la contaminación, hace mención a que los códigos de buenas prácticas agrarias deben contener disposiciones sobre los residuos procedentes de productos vegetales almacenados, como el forraje ensilado.

Con el presente trabajo se pretende determinar los principios nutritivos y la calidad fermentativa de ensilados de hierba elaborados con diferentes forrajes y utilizando aditivos de diversa naturaleza, así como el poder contaminante de los efluentes generados por estos ensilados, en orden a sugerir prioridades de actuación en la protección medioambiental.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material vegetal

En la primavera de 1996, se seleccionaron siete forrajes representativos del interior y zona costera asturiana. Dos correspondían a prados (PN-1 y PN-2), dos a la típica pradera de larga duración (*Lolium perenne-Trifolium repens*, PS-1 y PS-2) y tres a cultivo forrajero anual de *Lolium multiflorum* (RI-1, RI-2 y RI-3), con diferentes niveles de materia seca.

Las muestras fueron picadas a 2 cm y homogenizadas. Se tomaron cuatro diferentes submuestras, una para recuento de la microflora epífita en el momento de la siega, una

segunda para determinación de materia seca, la tercera para valorar la capacidad amortiguadora y la última para liofilizar y posterior análisis químico. El material restante fue empleado para la elaboración de ensilados a escala de laboratorio.

### **Elaboración de ensilados**

La hierba fue ensilada en recipientes cilíndricos de cloruro de polivinilo (PVC) de 50 cm de altura y 10 cm de diámetro, provistos de dispositivo para la captación de efluente de acuerdo con el modelo originalmente descrito por DE LA CONCHA y CARPINTERO (1986) y modificado posteriormente por FLORES *et al.* (1997) y MARTÍNEZ y DE LA ROZA (1997). Los ensilados fueron elaborados sin aditivo o con adición de: ácido fórmico al 85% a razón de 3,5 ml/kg de hierba; Morasil (melaza con minerales y propilenglicol), 6 ml/kg; Ecosyl (cepas seleccionadas de *Lactobacillus plantarum*), 2 ml/kg y Folia (cepas seleccionadas de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*, más celulasas y hemicelulasas), 3 ml/kg. Esta operación tuvo lugar inmediatamente antes de llenar los microsilos, empleando siempre entre 2 y 2,2 kg de forraje por microsilo para igualar densidad, realizándose dos repeticiones por tratamiento. En la parte superior de los microsilos se colocó un peso de 2 kg para ayudar a crear las condiciones de anaerobiosis y ejercer una presión vertical sobre el forraje.

### **Determinaciones analíticas**

#### ***a-Forraje de partida***

Previa a la elaboración de los ensilados, se efectuó el análisis microbiológico de los forrajes al momento de la recogida, cuantificando las unidades formadoras de colonias/gramo (UFC/g) de mesófilos totales en medio PCA, de coliformes totales en medio VRBA y de bacterias lácticas en medio MRS, así como el número más probable de esporas de *Clostridium tirobutyricum* presentes en medio TB por producción de gas durante siete días.

También fue evaluada la ensilabilidad de los forrajes, tras cuantificación del contenido en materia seca a 102°C 24 h, azúcares solubles (AZSOL) por el método de HOFFMAN (1937) y capacidad amortiguadora (CT) según PLAYNE y McDONALD (1966).

#### ***b-Ensilados resultantes***

Tras un periodo de fermentación y estabilización de 65 días, los ensilados fueron abiertos y homogenizados. Una alícuota fue prensada y sobre el jugo se determinó el pH

y demás parámetros fermentativos: Nitrógeno soluble total, nitrógeno amoniacal ( $\text{NNH}_3$ ), azúcares residuales, alcoholes (ALCH) por cromatografía de gases y ácidos grasos volátiles (AGV) y ácido láctico (LAC) por cromatografía líquida de alta resolución. Otra submuestra fue desecada a 60 °C 24 h para la determinación de materia seca (MS) y el resto se liofilizó para su posterior análisis químico-bromatológico, tras molienda a 0,75 mm.

El contenido en MS residual y cenizas (CEN) (Van der Meer, 1983) se determinó en un analizador termogravimétrico MAC-500 de LECO Inst.; el N Kjeldahl (proteína bruta  $\text{PB}=6,25 \times \text{N}$ ) según la técnica TECATOR, 1995; la fibra neutro detergente (FND) según VAN SOEST *et al.* (1991) y la digestibilidad enzimática de la materia orgánica (DEMO), empleando el método FND-celulasa (Riveros y Argamentoría, 1987). La energía metabolizable (EM) en MJ/kg MS, fue predicha según el MAFF (1984).

### ***c-Efluente***

Se tomó el peso inicial del forraje en cada microsilo, para expresar con respecto al mismo la producción total de efluente. Éste se recogió y pesó a los 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 43, y 65 días, midiéndose el pH y la densidad. Una alícuota proporcional del mismo (10%) fue acumulada en un recipiente mantenido a -20°C, para obtener una muestra media final representativa de su totalidad. Sobre ella se determinó el nitrógeno amoniacal ( $\text{NNH}_3$ ) (Test Spectroquant 1.14752 de Merck), nitrógeno soluble total (NSOL), por el método Kjeldhal (TECATOR, 1995), azúcares solubles, demanda química de oxígeno (DQO) con el Test Spectroquant 1455 de Merck y demanda biológica de oxígeno tras cinco días de incubación a 20°C (DBO) utilizando lodo de depuradora como simiente, ambos índices utilizados como indicadores de la contaminación de los vertidos y expresados como g de  $\text{O}_2$  consumidos por litro de efluente.

### ***d-Análisis estadísticos***

Se consideró un modelo factorial de análisis de varianza con los efectos fijos tipo de forraje y aditivo y su interacción (SAS, 1990).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los índices de ensilabilidad de los forrajes de partida, se establecieron con base en los contenidos de MS, AZSOL y CT, considerando como ensilabilidad alta los forrajes

con contenidos en MS>250 g/kg, AZSOL>150 g/kg MS y CT<250 meq/kg MS y ensilabilidad baja los forrajes con contenidos en MS<200 g/kg, AZSOL<80 g/kg MS y CT>350 meq/kg MS, respectivamente, estableciéndose una serie de índices intermedios (Playne y McDonald, 1966; Haigh, 1990).

En lo que respecta a la MS, los valores superiores a 250 g/kg, se corresponden con aprovechamientos tardíos, relacionados con bajos contenidos en PB y altos en FND.

Los raigrases se caracterizan por su elevado contenido en carbohidratos solubles, siempre superiores al 150 g/kg MS. Este valor ha sido considerado por HAIGH (1990) como la cantidad mínima para que se desarrolle correctamente la fermentación láctica asociada al proceso de ensilaje.

Como puede observarse en la tabla 1, sólo los raigrases superaron el límite mínimo establecido en AZSOL para conseguir una buena ensilabilidad, siendo únicamente el RI-3 el forraje que cumple los requisitos establecidos para alta ensilabilidad.

Los ácidos orgánicos de las plantas y sus sales constituyen un sistema tampón eficaz. Al aumentar la edad de la planta se incrementa la proporción tallo/hoja, los procesos metabólicos disminuyen y, como consecuencia, también el contenido en ácidos orgánicos. Por ello, la CT disminuye (Muck *et al.*, 1991; Martínez, 1994). Este hecho se constata en el comportamiento de los raigrases (tabla 1), concretamente en el RI-3 que al haber sido objeto de un aprovechamiento tardío, disminuyó su contenido en ácidos orgánicos y sales y, por tanto, se redujo su capacidad tampón.

TABLA 1  
Parámetros de ensilabilidad de los forrajes ensayados  
*Table 1. Ensilability parameters of the forages tested*

Tipo de pradera	Materia seca (g/kg)	Azúcares solubles (g/kg MS)	Capacidad tampón (meqNaOH/kg MS)	Ensilabilidad
Raigrás italiano RI-1	147,0	243,8	573,1	MEDIA-BAJA
Raigrás italiano RI-2	178,6	158,7	582,8	BAJA
Raigrás italiano RI-3	255,2	340,4	275,7	ALTA
Pradera PS-1	133,3	134,0	383,3	BAJA
Pradera PS-2	216,4	34,8	554,2	MUY BAJA
Prado PN-1	160,8	84,8	249,6	BAJA-MEDIA
Prado PN-2	253,9	96,7	272,3	MEDIA

La población bacteriana del forraje fresco varió en función de sus propias características (composición botánica, estado de madurez, tipo de forraje, etc.) y de las técnicas de manejo. Los microorganismos están generalmente representados por aerobios estrictos, anaerobios facultativos y pequeñas proporciones de anaerobios

estrictos (Dellaglio y Torriani, 1991). Las bacterias ácido lácticas van contaminando el material vegetal a lo largo del proceso de ensilaje y aumentan rápidamente tras el acondicionamiento del forraje en el silo, fermentando los carbohidratos solubles (Henderson, 1993). Normalmente, los forrajes contienen suficiente cantidad de bacterias. La dosis efectiva para iniciar una correcta fermentación se estima alrededor de  $10^5$  UFC/g de forraje (Cañeque y Sancha, 1998).

A la vista de los resultados de la tabla 2, RI-3, PS-1 y PN-1, pudieron tener dificultades para fermentar por insuficiente contenido en bacterias ácido lácticas. Además, en PN-1 el elevado recuento de esporas butíricas, probablemente debidas a una proliferación de adventicias (CIATA, 1995), agrava aún más este hecho.

Efectivamente, los prados de la Cornisa Cantábrica, por su mal manejo, están siendo invadidos por especies adventicias que además de suponer un detrimento importante en la calidad de las mismas, constituyen un serio problema a la hora de elaborar ensilados, puesto que favorecen la destrucción de la proteína y el desarrollo de fermentaciones butíricas (Argamentería *et al.*, 1997).

TABLA 2

### Recuento de la microflora epifita presente en los forrajes a ensilar en el momento de la siega

*Table 2. Epiphytic microflora counting at harvesting on the forages tested*

Tipo de pradera	Mesófilos totales (UFC)	Bacterias lácticas (UFC)	Esporas butíricas
Raigrás italiano RI-1	$1,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$
Raigrás italiano RI-2	$1,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	$3,4 \times 10^4$
Raigrás italiano RI-3	$9,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$
Pradera PS-1	$6,1 \times 10^5$	$8,9 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4$
Pradera PS-2	$1,7 \times 10^7$	$2,7 \times 10^6$	$5,5 \times 10^4$
Prado PN-1	$1,6 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$5,4 \times 10^5$
Prado PN-2	n.d.	n.d.	n.d.

UFC: Unidades formadoras de colonias; NMP: Nº más probable de esporas, por g de materia verde; n. d.: no determinado

### Principios nutritivos y fermentativos

Como se puede apreciar en la tabla 3, los ensilados procedentes de praderas tienen un mayor contenido en principios nutritivos que los prados. En los de raigrás italiano su composición y energía resultan aceptables, a excepción del RI-3 que muestra un bajo valor en PB (110,5 g/kg MS) como consecuencia de su recolección tardía.

En cuanto a los ensilados de praderas de raigrás y trébol, presentan un contenido proteico variable en función de la proporción de leguminosa presente en la mezcla. Su aprovechamiento algo tardío (FND > 500 g/kg MS), supone una severa pérdida de energía.

TABLA 3

**Principios nutritivos de los ensilados de hierba según tipo de forraje***Nutritive parameters of grass silages according to the forage type used*

Tipo de pradera	Materia seca (g/kg)	Proteína bruta (g/kg MS)	FND (g/kg MS)	Energía metabolizable*
Raigrás italiano RI-1	140,4e	163,5c	488,4e	10,4a
Raigrás italiano RI-2	226,0b	182,1b	428,8f	10,4a
Raigrás italiano RI-3	236,7a	110,5e	509,1d	10,3b
Pradera PS-1	146,5e	202,8a	515,4d	10,0c
Pradera PS-2	170,0d	181,6b	541,8c	9,7d
Prado PN-1	163,9d	142,3d	602,9b	8,7e
Prado PN-2	211,8c	108,2e	640,8a	8,8e

Distinta letra en la misma columna indica diferencia significativa a  $p < 0,05$ . : MJ/kg MS

En los ensilados de prado, el contenido en proteína bruta es bastante bajo. Generalmente, pocos superaron un 15 % sobre materia seca, consecuencia directa de una deficiente fertilización nitrogenada y un retraso en la fecha de corte, concordante con los altos contenidos en fibra (FND > 600 g/kg MS).

Los resultados de calidad nutritiva de los ensilados en función del aditivo empleado en su elaboración se muestran en la tabla 4. El ácido fórmico, a excepción del contenido en proteína, no mejora al testigo. El Morasil es el que reflejó resultados más prometedores, superando en todos los parámetros al testigo. Los aditivos biológicos, aunque mejoraron al testigo, no parecen tan efectivos. El Ecosyl, en concreto, no presentó diferencias significativas con él. Ninguno de los aditivos probados incrementó significativamente el residuo de cenizas ( $p < 0,05$ ), por lo que las diferencias en EM estimada se deben exclusivamente a mayor o menor digestibilidad con celulosa, que a su vez, y como era esperado, presentó correlación inversa con el contenido en FND.

TABLA 4

**Principios nutritivos de los ensilados de hierba según tipo de aditivo***Nutritive parameters of grass silages according to the additive used*

Aditivo	Materia seca (g/kg)	Proteína bruta (g/kg MS)	FND (g/kg MS)	Energía metabolizable*
DIRECTO	183,1b	145,1c	537,1bc	9,69c
AC. FÓRMICO	188,5ab	150,1b	543,4a	9,70c
MORASIL	191,1a	149,4b	523,6d	9,86a
ECOSYL	184,8ab	143,6c	538,8ab	9,73bc
FOLIA	188,2ab	152,8a	533,0c	9,80ab

Distinta letra en la misma columna indica diferencia significativa a  $p < 0,05$ . EM : MJ/kg MS

Para la EM, todos los aditivos fueron efectivos ( $p < 0,05$ ) cuando el material fue hierba de prados (PN), con muy baja ensilabilidad (contenido en azúcares  $< 150$  g/kg MS). En el caso de PS, los ensilados realizados con aditivos biológicos presentaron una EM inferior a la del testigo cuando el contenido en MS fue menor de  $180$  g/kg ( $p < 0,01$ ). Donde se observó una eficacia menor de los aditivos fue en los ensilados de RI, puesto que al tratarse de forrajes de buena ensilabilidad el proceso de fermentación se realizó correctamente en ausencia de los mismos.

En cuanto al pH (tabla 5), en todos los casos fue superior al límite de estabilidad (Haigh, 1987) cuando el contenido en MS del ensilado fue muy bajo (inferior a  $180$  g/kg). Además, PN-2, a pesar de su alto contenido en MS ( $211,8$  g/kg), también presentó un nivel de pH superior al límite de estabilidad, probablemente porque este prado sufrió una proliferación de especies vegetales no deseables. El valor de este parámetro en los ensilados elaborados en corte directo, como los utilizados en este trabajo, debe ser siempre inferior a  $4,0$  para asegurar una correcta fermentación.

Todos los ensilados de raigrás italiano (tabla 5), destacan por su elevado contenido en ácido láctico, indicador de intensa fermentación por parte de las bacterias ácido lácticas. El RI-1 presenta, sin embargo, indicios de fermentación butírica y alta amoniogénesis ( $4,70$  g/kg MS de  $\text{NNH}_3$ ), hechos justificados por tratarse de un forraje de partida con muy poca materia seca ( $147,0$  g/kg MS). El RI-3, a pesar de su alta ensilabilidad y en general de su buen perfil de parámetros fermentativos, tuvo un elevado contenido en alcoholes totales, predominando el contenido en etanol que supuso un  $97,87\%$  del total de alcoholes presentes en el jugo. Este ensilado, por su bajo pH y elevado contenido inicial de azúcares ( $340,4$  g/kg MS), se comportó como un substrato ideal para el desarrollo tanto de levaduras como de bacterias ácido lácticas que compitieron entre sí por la utilización del lactato como fuente de carbono (Woolford, 1984), teniendo también lugar una tumultuosa fermentación alcohólica.

TABLA 5

**Parámetros fermentativos de los ensilados de hierba según tipo de forraje***Fermentative parameters of grass silages according to the forage type used.*

Tipo de pradera	pH	NNH <sub>3</sub> g/kgMS	AZSOL g/kgMS	ALCH g/kgMS	ACET g/kgMS	BUTI g/kgMS	AGV mmol/kgMS	LAC g/kgMS
Raigrás italiano RI-1	4,26d	4,70c	7,13f	33,61b	47,68c	4,03c	242,53c	115,02b
Raigrás italiano RI-2	3,88e	1,65e	13,28c	16,23d	29,59d	0,05c	140,13de	144,68a
Raigrás italiano RI-3	3,70f	1,41e	40,19a	50,11a	17,90e	0,00c	84,23e	100,58c
Pradera PS-1	4,56bc	5,83b	10,49e	26,08c	81,05a	0,19c	381,01a	44,15d
Pradera PS-2	5,13a	7,85a	11,51d	12,40e	51,98c	28,77a	387,17a	18,40e
Prado PN-1	4,50c	3,27d	11,62d	28,11c	65,21b	0,00c	305,97b	13,12e
Prado PN-2	4,60b	4,09c	16,03b	5,81f	16,50e	15,42b	151,09d	41,07d

Distinta letra en la misma columna indica diferencia significativa a  $p < 0,05$ .NNH<sub>3</sub>: Nitrógeno amoniacal; AZSOL: Azúcares solubles; ALCH: Alcoholes totales; ACET: Ácido acético; BUTI: Ácido butírico; AGV: Ácidos grasos volátiles (acético+propiónico+butírico); LAC: Ácido láctico

Las praderas presentaron deficiente fermentación láctica, ya esperable por sus malos índices de ensilabilidad y los elevados contenidos en  $\text{NNH}_3$ . El nitrógeno amoniacal presente en la PS-2 se produjo probablemente como resultado de la desaminación de algunos aminoácidos y por la reducción de nitratos y nitritos a amonio por parte de las bacterias del género *Clostridium tirobutyricum* (Henderson, 1993). Éstas bacterias, presentes en los ensilados como agentes contaminantes y procedentes del suelo, pueden fermentar los azúcares y el ácido láctico hasta ácido butírico y su crecimiento se inhibe con  $\text{pH} < 4,0$ . En el caso concreto de este ensilado, el bajo contenido en azúcares solubles (34,8 g/kg MS) y la elevada capacidad tampón (554,2 meqNaOH/kg MS) del forraje inicial, dificultaron la bajada de pH, favoreciendo la proliferación de los clostridios que además generaron altos niveles de ácido butírico.

La hierba de los prados tampoco fermentó correctamente. La elevada concentración de ácido butírico en PN-2, quizás esté relacionada con la proliferación de especies adventicias portadoras de especies de clostridios, ya comentada.

En la tabla 6 se puede observar como el ácido fórmico demostró su gran eficacia en la reducción de pH, seguido del Morasil.

**TABLA 6**  
**Parámetros fermentativos de los ensilados de hierba según tipo de aditivo**  
*Fermentative parameters of grass silages according to the additive used.*

Aditivo	pH	NNH, g/kgMS	AZSOL g/kgMS	ALCH g/kgMS	ACET g/kgMS	BUTI g/kgMS	AGV mmol/kgMS	LAC g/kgMS
DIRECTO	4,31a	3,75bc	12,27c	21,34b	45,78a	6,53ab	246,65a	84,73ab
AC. FÓRMICO	4,09c	3,30c	28,09a	33,27a	25,81c	4,15ab	141,64b	64,96d
MORASIL	4,19b	3,79b	12,73c	16,49c	37,76b	5,73ab	205,43a	91,78a
ECOSYL	4,29a	4,39a	15,42b	21,23b	42,03ab	9,04a	243,06a	74,20c
FOLIA	4,25ab	3,61bc	13,36c	21,64b	45,94a	1,46b	223,61a	76,67bc

Distinta letra en la misma columna indica diferencia significativa a  $p < 0,05$ .

NNH: Nitrógeno amoniacal; AZSOL: Azúcares solubles; ALCH: Alcoholes totales; ACET: Ácido acético; BUTI: Ácido butírico; AGV: Ácidos grasos volátiles (acético+propiónico+butírico); LAC: Ácido láctico

Si consideramos la proporción LAC/ACET como un buen indicador de los procesos fermentativos acontecidos durante el periodo de estabilización del ensilado, los mejores resultados correspondieron al ácido fórmico y al Morasil: 2,517 y 2,430, respectivamente. A pesar de que los aditivos restrictores limitan la producción de láctico, minimizan también fermentaciones secundarias.

En términos generales, son los aditivos ácido fórmico y Morasil los que arrojan mejores resultados.

En cuanto a la interacción forraje \* aditivo, para el valor de pH el ácido fórmico es el aditivo más efectivo, mostrando diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) respecto al testigo siempre que el contenido en MS del ensilado sea inferior al 18%.

Para el RI-1, ningún aditivo mejoró el desarrollo de su fermentación láctica. El bajo contenido en MS del forraje de partida dificultó la proliferación de bacterias ácido lácticas, lo cual a su vez dificultó la transformación del sustrato fermentescible (AZSOL=243,8 g/kg MS). El resto de ensilados no vieron afectado su contenido en LAC por el uso de aditivos, a excepción de PS-1 por la adición de Morasil.

La fermentación butírica se redujo con todos los aditivos en RI-3 y PN-2 ( $p < 0,05$ ). En estos ensilados, sus contenidos en MS > 250 g/kg inhibieron la multiplicación de los clostridios sensibles al incremento de presión osmótica del medio de desarrollo. La pérdida de agua de los forrajes origina un aumento de la presión osmótica por concentración de solutos (Castle, 1982).

### Poder contaminante de los efluentes

En todos los casos (tabla 7), la producción total de efluente está en relación inversa con el contenido en materia seca del forraje. Si ésta es superior a 250 g/kg, se origina una ínfima producción en concordancia con los modelos de regresión según los cuales se anula la producción con contenidos entre 250 y 300 g/kg (McDonald, 1976; Woolford, 1984; CIATA, 1995).

TABLA 7

### Producción total, componentes, demanda química y biológica de oxígeno (DBO y DQO) del efluente, según tipo de forraje y su contenido en materia seca.

*Total production, components and chemical and biological oxygen demand of the effluent, according to the forage type used and its dry matter content*

Tipo de pradera	Materia seca (g/kg)	Producción efluente (l/t)	N NH <sub>3</sub> (g/l)	N soluble (g/l)	Azúcares solubles (g/l)	DBO (gO <sub>2</sub> /l)	DQO (gO <sub>2</sub> /l)
RI-1	147,0d	257,5a	0,393c	1,82d	6,19b	37,69b	58,71b
RI-2	178,6c	21,8c	0,701a	3,84a	2,62c	63,06a	70,42a
RI-3	255,2a	0,20d	---	---	---	---	---
PS-1	133,3e	239,1a	0,402c	2,11c	11,94a	26,65d	46,80c
PS-2	216,4b	90,7b	0,615b	2,28b	2,72c	30,07c	47,16c
PN-1	160,8cd	96,2b	0,307d	1,11e	0,41d	21,36e	35,71e
PN-2	253,9a	NULA	---	---	---	---	---
N. Sig.	***	***	*	***	***	**	**

Distinta letra en la misma columna indica diferencia significativa al nivel indicado (N. Sig.): \*\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,1$

En cuanto a la concentración de nitrógeno amoniacal y nitrógeno soluble total, fue particularmente elevada en el caso del forraje procedente de RI-2 y PS-2. Esto concuerda con el hecho de que en dichos forrajes se produjeron las mayores pérdidas en proteína bruta durante el proceso de ensilaje, 5 y 3 unidades porcentuales, respectivamente. En contrapartida, en los ensilados de RI-1 y PS-1 las pérdidas más notables correspondieron a los azúcares solubles. Esto último puede ser imputable a los valores más bajos de materia seca, lo cual motiva una mayor velocidad de producción de efluente durante los tres primeros días, perdiéndose así mayor cantidad de estos substratos necesarios para la posterior fermentación.

En cuanto a la DBO y DQO, los efluentes procedentes del ensilaje de los cultivos de raigrás italiano, especialmente de RI-2, presentaron valores superiores a los correspondientes de las praderas.

El inoculante con enzimas (Folia) incrementó significativamente la producción de efluente respecto al testigo (tabla 8), lo que concuerda con los trabajos de McALLAN *et al.* (1991). Por otra parte, la producción media de efluente de los ensilados tratados con el aditivo Morasil fue un 16 % superior a la del testigo, aunque sin diferencias significativas. De cualquier manera, dado el incremento en energía inducido por este aditivo, lo anterior no debió suponer un mayor drenaje de principios nutritivos digeribles o bien se compensó por economía de los mismos durante los procesos fermentativos. El mayor contenido celular final lo confirma.

Todos los aditivos redujeron la concentración en nitrógeno soluble y amoniacal, respecto al testigo. Los mejores resultados correspondieron al ácido fórmico, seguido de los inoculantes. Este efecto fue inverso con respecto a la proporción de azúcares solubles en el efluente, puesto que el ácido fórmico actúa restringiendo la fermentación.

TABLA 8

**Producción total, componentes, demanda química y biológica de oxígeno (DBO y DQO) del efluente, según tipo de aditivo empleado.**

*Total production, components and chemical and biological oxygen demand of the effluent, according to the additive used.*

Aditivo	Producción efluente (l/t)	N NH3 (g/l)	N soluble (g/l)	Azúcares solubles (g/l)	DBO (gO <sub>2</sub> /l)	DQO (gO <sub>2</sub> /l)
NINGUNO	143.4b	0,636a	2,94a	2,00d	38,13b	61,05a
ECOSYL	152,0ab	0,513b	2,32c	3,54c	36,83b	54,82b
FOLIA	175,6a	0,530b	2,37c	3,80c	35,19b	48,93b
AC. FÓRMICO	123,8bc	0,413c	2,26c	14,21a	43,44a	57,01a
N. Sig.	*	*	***	***	***	*

Distinta letra en la misma columna indica diferencia significativa al nivel indicado (N. Sig.): \*\*\* p<0.01; \*p<0.1

En cuanto al poder contaminante respecto al testigo, los aditivos biológicos lo disminuyeron (igual DBO y menor DQO) y el fórmico y Morasil lo aumentaron (mayor DBO e igual DQO). Estos efectos fueron más acusados en el caso del raigrás italiano RI-2 (79,0 y 81,5 g O<sub>2</sub>/l de DBO con fórmico y Morasil, respectivamente, frente a 54,0 del testigo).

En la tabla 9, se muestran las interacciones más relevantes tipo de pradera\*aditivo, tomando como valor de referencia testigo \* tipo de pradera = 0.

TABLA 9

**Interacciones aditivo \* tipo de pradera más relevantes, tomando testigo \* tipo de pradera = 0 como valor de referencia.**

*Main significant interactions additive \* forage type. Reference value: control \* forage type =0*

Aditivo: Tipo de pradera:	Ecosyl	Folia	Ác. fórmico	Morasil
<b>RI - 1</b>	Acét: +27,4 * Lác: -57,9 **		FND: +23,0 * EM: -0,4 * Azsol: -1,7 *** Alch: +22,9 ** DBO: +8,8 **	Lác: -52,8 **
<b>RI - 2</b>	PB: -22,0 *** FND: +33,0 ** EM: -0,3 *	DBO: -9,3 * DQO: -27,7 **	EM: -0,4 * DBO: +30,6 ***	PB: -22,0 *** DBO: +31,7 ***
<b>RI - 3</b>	Alch: +28,6 ***	Alch: +22,4 **	Alch: +58,3 ***	
<b>PS - 1</b>	FND: +42,0 *** EM: -0,3 * Efl: -128,0 *** DQO: -13,7 *	PB: -22,0 *** FND: +32,0 ** Efl: +57,5 * DQO: -12,9 *	PB: +15,0 * Azsol: -1,7 *** Acét: -40,4 ** Lác: +36,9 * Efl: -142,4 ***	pH: -0,63 *** NNH3 -2,4 * Acét: -46,6 ** AGV: -224,0 * Lác: +71,1 ***
<b>PS - 2</b>	FND: +35,0 ** Acét: +29,1 * Buti: +25,3 * AGV: +275,0 *	pH: -0,30 * NNH3 -2,9 ** Buti: -24,7 * Efl: +56,5 *	PB: +23,0 *** FND: -26,0 * pH: -1,2 *** NNH3 -4,7 *** Alch: -17,7 * Buti: -35,3 ** AGV: -248,0 * Lác: +84,6 *** Efl: +65,6 *	PB: -13,0 * Efl: +60,1 *
<b>PN - 1</b>	Acét: +39,8 **	PB: -13,1 * EM: +0,3 *	FND: -54,0 *** EM: +0,6 *** pH: -0,8 *** Azsol: +1,7 *** Lác: +88,1 *** Efl: +91,1 ** DBO: +9,8 **	
<b>PN - 2</b>		EM: +0,3 *	FND: -25,0 * Azsol: +2,0 *** Lác: +43,8 *	FND: -27,0 *

\*\*\* : p<0,001; \*\* : p<0,01; \* : p<0,05

PB: Proteína bruta (g/kg MS); FND: Fibra neutro detergente (g /kgMS); EM: Energía metabolizable (MJ/kg MS)

NNH3: N amoniacal (g/kg MS); Azsol: Azúcares solubles en jugo (g/kg MS); Alch: Alcoholes totales (g/kg MS);

Acét: Ác. acético (g/kg MS); Buti: Ác. Butírico (g/kg MS); AGV: Ác. grasos volátiles (mmol/kg MS);

Lác: Ác. láctico (g/kg MS); Efl: Producción de efluente (L/t)

DBO: Demanda biológica de oxígeno (gO<sub>2</sub>/L); DQO: Demanda química de oxígeno (gO<sub>2</sub>/L)

## CONCLUSIONES

El Morasil es el aditivo que produjo resultados más prometedores en lo que a calidad nutritiva del ensilado se refiere. Los aditivos biológicos no se mostraron tan efectivos. Todos los aditivos ensayados fueron eficaces con la hierba de prados de baja ensilabilidad. Con los cultivos forrajeros de raigrás italiano (alta ensilabilidad) no resultó efectivo ninguno de los aditivos utilizados en cuanto a mejora de la composición química o valor energético del ensilado obtenido.

El empleo de ác. fórmico redujo sistemáticamente el pH en ensilados con contenidos en MS inferiores a 180 g/kg. Globalmente, los mejores resultados en parámetros fermentativos se correspondieron con los ensilados elaborados con ácido fórmico y Morasil.

La producción total de efluente estuvo en relación inversa con el contenido en materia seca. Valores superiores a 250 g/kg la minimizaron y a partir de 300 g/kg se anuló completamente su producción.

Los efluentes de los cultivos de raigrás italiano, presentaron índices de contaminación superiores al resto de los tipos de forraje estudiados.

Los inoculantes, fueron efectivos para reducir los niveles de DBO y DQO. En el caso de los aditivos que incorporan enzimas, la mayor producción de efluente enmascaró este efecto positivo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al INIA la financiación del proyecto de investigación INIA SC97-026 que ha hecho posible el desarrollo de este estudio y al personal del Laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA (Sagrario Modroño, Ovidio Fernández, M<sup>a</sup> Angeles Méndez y Gabriela De Anda), así como al personal de campo (M<sup>a</sup> Antonia Cueto, Amalia Coto, Mercedes García, José Manuel Fernández, Zósimo Caveda y José Ramón Díaz), sin cuya colaboración habría sido imposible la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGAMENTERÍA, A.; de la ROZA, B.; MARTÍNEZ, Adela.; SÁNCHEZ, L.; MARTÍNEZ, A., 1997. *El ensilado en Asturias*. Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria (C. I. A. T. A.). Servicio de Publicaciones del Principado de Asturias, 127 pp. Oviedo. Asturias (España).
- CAÑEQUE, V.; SANCHA, J. L., 1998. *El ensilado de forrajes y su empleo en la alimentación de rumiantes*. Mundi Prensa, 260 pp. Madrid (España).

- CASTLE, M. E., 1982. Making high-quality silage. En: *Silage for milk production*. Eds. J.A. ROOK, P.C. THOMAS. Technical Bulletin 2. England (Reino Unido).
- CIATA, 1995. Memoria de Investigación Agroalimentaria, 95-98. Consejería de Agricultura del Principado de Asturias. Asturias (España).
- De la CONCHA, M. E.; CARPINTERO, M. C., 1986. Proteolisis en los ensilados y su valoración. I. Efecto de diferentes conservadores sobre la proteolisis en ensilados de gramíneas y leguminosas. *An. Fac. Vet. León*, **32**, 109-117.
- DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S., 1991. Microbiological methods. *Landbauforschung Volkenrode, Sonderheft*, **123**, 206-217.
- FLORES, G., GONZÁLEZ-ARRÁEZ, A.; CASTRO, J., 1997. Evaluación de la utilidad de dos tipos de silos a pequeña escala para experimentación en calidad de ensilados. *Actas de la XXXVII Reunión Científica para el Estudio de los Pastos*, 373-378.
- HAIGH, P. M., 1987. The effect of dry matter content and silage additives on the fermentation of grass silage on commercial farms. *Grass and Forage Science*, **42**, 1-8.
- HAIGH, P. M., 1990. Effect of herbage water soluble carbohydrate content and weather conditions at ensilage on the fermentation of grass silages made on commercial farms. *Grass and Forages Science*, **45**, 363-371.
- HENDERSON, N., 1993. Silage additives. *Animal Feed Science and Technology*, **45**, 35-56.
- HOFFMAN, W. S., 1937. A rapid photoelectric method for the determination of glucose in blood and urine. *J. Biol. Chem*, **120**, 51-55.
- MARTÍNEZ, A., 1994. *Evolución de la actitud para ensilar de las especies: Lolium perenne, Lolium multiflorum y Dactylis glomerata*. Universidad de Oviedo, 25 pp. Oviedo (España)
- MARTÍNEZ, A.; de la ROZA, B., 1997. Poder contaminante de los efluentes de ensilados de hierba y raigrás italiano según materia seca del forraje inicial y aditivo utilizado. *Actas de la XXXVII Reunión Científica para el Estudio de los Pastos*, 199-204.
- McALLAN, A. B.; JACOBS, J. L.; MERRY, R. J., 1991. Factors influencing the amount and pattern of silage effluent production. *Proceedings of Conference on Forage Conservations. Towards 2000*. Braunschweig.
- McDONALD, P., 1976. Trends in silage making. En: *Microbiology in Agriculture, Fisheries and Food*, 109-123. Eds. F.A. SKINNER, J.G. CARR. Academic Press. London (Reino Unido).
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, 1976. *Farm waste management, silage effluent*. Short Term Leaflet, N° 87, 4 pp.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD, 1984. *Energy allowances and feeding systems for ruminants*. Reference Book 433. Her Majesty's Stationery Office, 71pp. London (Reino Unido).
- MUCK, R. E.; O'KIELY, P.; WILSON, R. K., 1991. Buffering capacities in permanent pasture grasses. *Irish Journal of Agricultural Research*, **30**, 129-141.
- PLAYNE, M. J.; McDONALD, P., 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *J. Sci. Food. Agri*, **17**, 264-268.
- RIVEROS, E.; ARGAMENTERIA, A., 1987. Métodos enzimáticos de la predicción de la digestibilidad in vivo de la materia orgánica de forrajes. I. Forrajes verdes. II. Henos. III. Ensilados y pajas. *Avances en Producción Animal*; **12**, 49-75.
- S.A.S., 1990. *SAS/STAT Users Guide*. Ver. 6, 4<sup>th</sup>. SAS Inst. Inc. North Carolina (EE.UU.).

- TECATOR. Application Note., 1995. AN 300. *The determination of nitrogen according to Kjeldahl using block digestion and steam distillation*. Perstorp Analytical.
- VAN DER MEER, J. M., 1983. C. E. C. Workshop on methodology of feedingstuffs for ruminants. European in vitro Ringtest Statistical Report. Ins. Voor Veevoedingsonderzoek (I. V.V.O). Concep Report 155, 36 pp. The Netherlands.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B; LEWIS, B. A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to Animal Nutrition. *J. Dairy. Sci.* **74**, 3583-3597
- WILKINSON, J. M.; WADEPHUL, F.; HILL, J., 1996. En: *Silage in Europe. A survey of 33 countries*. Chalcombe Publications, 154 pp.
- WOOLFORD, M. K., 1984. *The Silage Fermentation*. Marcel Dekker, Inc. 350 pp. New York and Basel.

## **EFFECT OF TREATING GRASS AND ITALIAN RYEGRASS WITH DIFFERENT ADDITIVES ON NUTRITIVE AND FERMENTATIVE SILAGE QUALITY AND EFFLUENT POLLUTION INDEX.**

### **SUMMARY**

In order to study the effect of different additives on nutritive and fermentative silage quality and on the effluent pollution index, laboratory silages were made using spring grass from seven grasslands located in the Northwest Spain: 2 of permanent pastures, 2 of perennial ryegrass-white clover pastures (*Lolium perenne-Trifolium repens*) and 3 of Italian ryegrass swards (*Lolium multiflorum*), with different dry matter contents. Each of the grass types was treated with each one of the following additives: formic acid 85% at 3.5 cc kg<sup>-1</sup> of grass, Morasil (molasses with minerals and propylenglycol) at 6 cc kg<sup>-1</sup>, Ecosyl (lactic acid bacteria) at 2 cc kg<sup>-1</sup> and Folia (lactic acid bacteria, cellulases and hemicellulases) at 3 cc kg<sup>-1</sup> or no additive (control).

In grasses with low ensilability values, all additives were effective. The nutritive parameters and metabolizable energy content (MJ/kg MS) were improved (p<0.05). In silages with dry matter content lower than 18 %, the formic acid gave the best results (p<0.001).

Comparing with control, all additives were effective in decreasing the pH (p<0.05). As a whole, the better results were obtained with formic acid and Morasil additives.

Concerning to effluent polluting effect of grass silages, to reduce or stop effluent production and to minimize the nutrient losses is necessary to obtain an initial dry matter content above 250 g kg<sup>-1</sup>. In general, to minimize the nutrient losses and the effluent pollution environmental effect is necessary to increase the dry matter content.

BOD and COD index in Italian ryegrass swards were higher than other grasses tested. The inoculants are able to reduce the BOD and COD levels. However, the biological additive with enzymes used (Folia), increased the total silage effluent production. As a result, the global contamination rate with Folia was higher than other additives tested.

**Key words:** Grass silages, nutritive value, fermentative quality, Biological Oxygen Demand, Chemical Oxygen Demand.