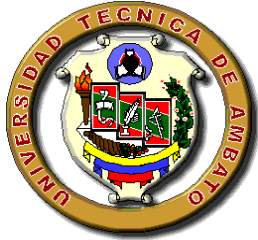


UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE *Bacillus spp.* EN ENSILAJE DE MAÍZ (*Zea mays*)
SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN RUMINAL *in situ* Y
FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro*.**

Trabajo de investigación previo a la obtención del título de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

Autor:

Ricardo Solís Villacrés

Tutor:

Marcos A. Barros Rodríguez, Ph.D

Ambato – Tungurahua – Ecuador, 2017

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El suscrito RICARDO DAVID SOLIS, portador de la cédula de identidad número: 1804318937, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: “**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE *Bacillus spp.* EN ENSILAJE DE MAÍZ (*Zea mays*) SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN RUMINAL *in situ* Y FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro***” es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



Ricardo David Solís Villacrés

C.C: 1804318937

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE *Bacillus spp.* EN ENSILAJE DE MAÍZ (*Zea mays*) SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN RUMINAL *in situ* Y FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro***” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario y Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él”.



Ricardo David Solís Villacrés

C.C: 1804318937

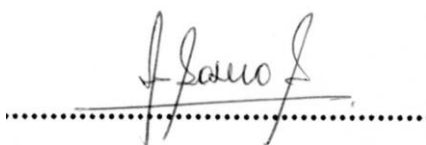
**“EFECTO DE LA ADICIÓN DE *Bacillus spp.* EN ENSILAJE DE MAÍZ (*Zea mays*)
SOBRE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN RUMINAL *in situ* Y
FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro*.”**

REVISADO POR:



Marcos A. Barros Rodríguez, Ph.D

TUTOR



Dr. Marco Rosero Peñaherrera, Mg.
ASESOR DE BIOMETRÍA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN:

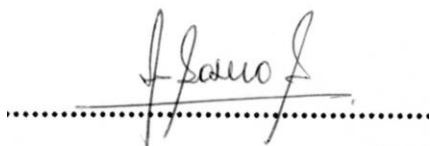
FECHA



2017 – 09 – 28

Ing. Mg. Hernán Zurita Vásquez

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



2017 – 09 – 28

Dr. Marco Rosero Peñaherrera, Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



2017 – 09 – 28

Dr. Mg. Efraín Lozada Salcedo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ayudarme a culminar una esta meta en mi vida, a la Universidad Técnica de Ambato por permitirme ser parte de uno de sus proyectos de Biomasa de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

A mi tutor, redactor y biometrista quienes fueron mi guía en el transcurso de la elaboración de mi tesis ya que me brindaron su apoyo, conocimientos y quienes siempre estuvieron pendientes del progreso y desarrollo del proyecto.

A mis padres que son la fuente de inspiración y la fuerza de mi superación en lo profesional y personal, por todo el apoyo brindado para poder realizar mis estudios.

Un infinito agradecimiento a mis hermanos, primos, amigos, compañeros y docentes, que me brindaron su apoyo a lo largo de la carrera para no desmayar y seguir adelante, gracias totales.

DEDICATORIA

Dedico a Dios, por guiar mi camino y permitirme llegar a cumplir una meta más con la ayuda de mis padres que siempre estuvieron presentes cuando más apoyo necesitaba, a mis abuelos por sus grandes enseñanzas y consejos, al igual que mi primo Leonardo Ortiz que ha sido pilar fundamental como una guía y apoyo en mi formación.

A mis hermanos que me han ayudado a seguir siempre adelante, al igual que no faltan mis tíos, primos y amigos que me han acompañado en todo este transcurso dentro y fuera de la universidad, a los docentes por los conocimientos y enseñanzas compartidas que me van a servir para mi vida profesional y hacen de este día especial e inolvidable.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	3
REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Producción ganadera.....	3
2.2. Situación económica actual de ganadería	3
2.3. Alimentación ganadera en Ecuador	4
2.4. Alternativas de alimentación ganadera.....	4
2.5. Ensilaje.....	6
2.5.1. Primera etapa: Fase Aeróbica	6
2.5.2. Segunda etapa: Fase de Fermentación	7
2.5.3. Tercera etapa: Fase Estable	7
2.5.4. Cuarta etapa: Fase de Deterioro Aerobio	8
2.6. Tipos de silos.	9
2.7. Ensilaje de maíz.....	10
2.8. Aditivos para ensilaje.....	10
2.8.1. Inoculantes	11
2.8.2. Enzimas	11
2.8.3. Bacillus spp.	12
• Xilanasas	14
• Celulasas.....	14
CAPÍTULO III.....	15
3.1. HIPÓTESIS	15
3.2. OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
CAPÍTULO IV	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Ubicación del experimento.....	16
4.2. Equipos y Materiales.....	16
4.2.1. Equipos.....	16
4.2.2. Materiales	16
4.3. Factores en estudio	17
4.3.1. Preparación de los silos y tratamientos	17

4.4. Variables respuesta	18
4.4.1. Degradación ruminal de nutrientes in situ	18
4.4.2. Producción de gas in vitro y digestibilidad in vitro.....	19
4.4.3. pH ruminal.....	20
4.4.4. Análisis químicos	20
4.5. Diseño experimental y análisis estadísticos.....	20
CAPÍTULO V.....	21
5.1. RESULTADOS.....	21
5.1.1. Análisis Químico.....	21
5.1.2. Degradación ruminal de nutrientes <i>in situ</i>	21
5.1.3. Producción de gas <i>in vitro</i>	24
5.1.4. Digestibilidad <i>in vitro</i> , pH y Nitrógeno Amoniacal (NH ₃).....	24
5.1.5. Ácidos grasos volátiles.....	27
5.2. DISCUSIÓN.....	27
CAPÍTULO VI.....	30
6.1. CONCLUSIONES	30
6.2. BIBLIOGRAFÍA	31
6.3. Anexos	37
CAPITULO VII	43
PROPUESTA	43
7.1. DATOS INFORMATIVOS	43
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	43
7.3. JUSTIFICACIÓN	44
7.4. OBJETIVOS.....	44
7.4.1. Objetivo general	44
7.4.2. Objetivos específicos.....	44
7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	45
7.6. FUNDAMENTACIÓN.....	45
7.7. METODOLOGÍA	45
7.8. ADMINISTRACIÓN	45
7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN.....	46

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL RASTROJO DE MAÍZ ENSILADO CON <i>BACILLUS SPP.</i> HASTA LOS 30 DÍAS.....	21
TABLA 2. DEGRADACIÓN RUMINAL <i>IN SITU</i> DE MS, MO Y FDN (G/KG EXCEPTO DONDE SE SEÑALA LO CONTRARIO) DE RASTROJO DE MAÍZ ENSILADO CON <i>BACILLUS SPP.</i> HASTA LOS 30 DÍAS.	22
TABLA 3. PARÁMETROS DE PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i> (ML/0.5G MS DEGRADADA) DEL RASTROJO DE MAÍZ ENSILADO A 30 DÍAS CON <i>BACILLUS SPP.</i>	25
TABLA 4. PARÁMETROS DE PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i> (ML/0.5G MS FERMENTADA) DEL RASTROJO DE MAÍZ ENSILADO A 30 DÍAS CON <i>BACILLUS SPP.</i>	26
TABLA 5. DIGESTIBILIDAD DE NUTRIENTES <i>IN VITRO</i> , PH Y NITRÓGENO AMONIAICAL (NH ₃)	27
TABLA 6. ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGVS) <i>IN VITRO</i>	29

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la adición de *Bacillus spp.* en ensilaje de rastrojo de maíz (*Zea mays*) sobre la cinética de degradación ruminal *in situ* y fermentación ruminal *in vitro* de acuerdo a un diseño completamente al azar, con cuatro tratamientos dosis de *Bacillus spp.* (0, 1.5, 3, 4.5 ml/Kg MS). Se determinó el contenido de Materia Seca (MS), materia orgánica (MO), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y se calculó la Degradación Efectiva (DE) de MS. La digestibilidad *in vitro* consistió en la incubación de las muestras con líquido ruminal durante 48 h, la degradación *in situ* de MS se realizó en 6 bovinos machos castrados, con un peso de aproximadamente 450 kg, de raza mestiza, provistos de una fistula con cánula en el rumen (Bar Diamond, Parma, Idaho, USA). Mantenidos en corrales de techo de zinc y piso de cemento, a los animales se los alimento con una dieta a base de forraje de alfalfa, los tiempos de incubación fueron de 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h. Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Orskov & McDonald (1979) para establecer las fracciones soluble (a), insoluble pero potencialmente degradable (b), las tasa de degradación en % por hora (c), tasas de pasaje (k) 0.02, 0.05 y 0.08 (k/%h) y la degradabilidad efectiva (DE). Con respecto a la degradabilidad de MS los tratamientos T3 y T4 registraron mayores valores en la fracción insoluble pero potencialmente degradable (b) (45% y 44% respectivamente). En cuanto a la degradación ruminal de la MO, la fracción soluble (a) fue mayor ($P < .0001$) en T1 (37%), T2 (39%) y T4 (38%) con relación al T3, la fracción insoluble pero potencialmente degradable (b) fue mayor ($P < .0001$) en T3 (45%) y T4 (44%). La degradación efectiva con las diferentes tasas de pasaje (k) fue mayor ($P > 0.05$) en T2 y T4 con relación a los demás tratamientos. La digestibilidad *in vitro* de la MS y MO no mostró diferencias ($P = 0.1372$ y $P = 0.1169$ respectivamente) entre tratamientos. El pH ruminal en las horas 4 y 12 disminuyo en los tratamientos T1, T2, T3 en comparación a T4 (7.11 y 7.36 respectivamente) post incubación. El Nitrógeno Amoniacal (NH_3) presenta diferencias estadísticas entre tratamientos en las horas 2, 4 y 8 de muestreo post incubación, obteniendo el mayor ($P < 0.05$) NH_3 los experimentos incubados con el ensilaje tratado con la mayor dosis de *Bacillus spp.* T4. En la producción de AGVs el ácido Propiónico es mayor en los tratamientos T3 y T4 en las horas (2, 4) y (2, 4 y 8) respectivamente.

Palabras claves: *in vitro*, *in situ*, digestibilidad, producción de gas, degradación, materia seca, materia orgánica, fibra detergente neutra, fibra detergente ácida.

SUMMARY

The effect of the addition of *Bacillus spp.* in maize (*Zea mays*) stubble silage was evaluated on the in situ ruminal degradation kinetics and ruminal fermentation in vitro according to a completely randomized design with four dose treatments of *Bacillus spp.* (0, 1.5, 3, 4.5 ml/Kg DM). Determined the content of Dry Matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (FDA) and the Effective Degradation (ED) of DM. In vitro digestibility consisted of incubating the samples with ruminal fluid for 48 h, in situ degradation of MS was performed in 6 male castrated cattle, weighing approximately 450 kg of mestizo breed, with a cannula fistula in the rumen (Bar Diamond, Parma, Idaho, USA). Maintained in zinc roof pens and cement floor, the animals were fed with a diet based on alfalfa fodder, the incubation times were 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h. The data obtained were adjusted to the model of Orskov & McDonald (1979) to establish the soluble (a), insoluble but potentially degradable fractions (b), degradation rates in % per hour (c), passage rates (k) 0.02, 0.05 and 0.08 (k /% h) and effective degradability (ED). Regarding the degradability of DM, the treatments T3 and T4 showed higher values in the insoluble but potentially degradable fraction (b) (45% and 44%, respectively). In relation to ruminal degradation of OM, soluble fraction (a) was higher ($P = <.0001$) in T1 (37%), T2 (39%) and T4 (38%) in relation to T3, the Insoluble fraction but potentially degradable (b) was higher ($P = <.0001$) in T3 (45%) and T4 (44%). The effective degradation with different passage rates (k) was greater ($P > 0.05$) in T2 and T4 than in the other treatments. The in vitro digestibility of DM and OM did not show differences ($P = 0.1372$ and $P = 0.1169$, respectively) between treatments. The ruminal pH in the 4 and 12 hours decreased in treatments T1, T2, T3 compared to T4 (7.11 and 7.36 respectively) post-incubation. Ammonia Nitrogen (NH₃) presented statistical differences between treatments at hours 2, 4 and 8 post-incubation sampling, obtaining the highest ($P < 0.05$) NH₃ the experiments incubated with the silage treated with the highest dose of *Bacillus spp.* (T4). In the production of VFAs, propionic acid is higher in treatments T3 and T4 in hours (2, 4) and (2, 4 and 8) respectively.

Key words: *in vitro*, *in situ*, digestibility, gas production, degradation, dry matter, organic matter, neutral detergent fiber, acid detergent fiber.

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

La producción ganadera en el Ecuador se basa en pastoreos rotativos, y la producción de pastizales está a expensas de las condiciones climáticas (época de lluvias o sequía). En la época de secas el rendimiento y valor nutricional de la biomasa forrajera es limitada, lo cual reduce el desempeño productivo de los animales. Una alternativa para el productor es la utilización de fuentes alimenticias a base de ensilaje, henolaje y subproductos agroindustriales lo que permite subsanar la deficiencia nutricional a bajo costo (Asar *et al.*, 2010).

El proceso de ensilaje en bolsas plásticas permite conservar el forraje en un estado físico-químico parecido al que tiene en el momento de la recolección (Caraballo, 2012). La utilización de la planta de maíz sin la mazorca para ensilar puede ser viable debido a la gran disponibilidad de este tipo de forraje durante el año (Garcés *et al.*, 2004). Sin embargo, el contenido de fibra puede ser elevado (FDA 29%, FDN 56%) (Rendón *et al.*, 2013) lo que reduce la disponibilidad de los nutrientes a la acción de los microorganismos del rumen. Como estrategia para aumentar la recuperación de los carbohidratos solubles en los ensilajes es la utilización de aditivos como biocatalizadores (hogos, bacterias, levaduras *etc*) mismos que a través de las enzimas que producen pueden ayudar a solubilizar la pared celular (Bhat; Hazlewood, 2001).

En este sentido, la utilización de *Bacillus ssp.* podría ayudar a mejorar la calidad nutricional del ensilaje debido a que estos microorganismos generan enzimas con capacidad de hidrolizar principalmente celulosa y hemicelulosa (Ooi y Kikuchi, 1995) mejorando la digestión de los nutrientes a nivel ruminal (Hristov; McAllister 2002). Varias investigaciones han demostrado que la incorporación de *Bacillus spp.* a la dieta de los rumiantes mejoró la degradación de la fibra, incremento la producción de AGVs y la síntesis de proteína microbiana y se redujo el nitrógeno amoniacal en el rumen, y esto produjo mayor rendimiento productivo en los rumiantes (leche y carne) (Quiao *et al.*, 2008), también mencionan Blaxter y Clapperton, (2005) que se redujo la producción de gases de efecto invernaderos. Con base en estos antecedentes, el objetivo de esta

investigación es determinar el efecto de la adición de *Bacillus spp.* en ensilaje de maíz (*zea mays*) sobre la cinética de degradación ruminal *in situ* y fermentación ruminal *in vitro*.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Producción ganadera.

En nuestro país la actividad ganadera es ampliamente representativa por lo que exige una alta demanda de producción de forraje para la alimentación, lo cual abre la oportunidad de implementar nuevas técnicas y alternativas de alimentación, conservación de forrajes como el ensilaje, henolaje y disminuir la competitividad de forrajes (Escobar, 1996). El interés por la utilización de residuos agrícolas en la alimentación de rumiantes se ha venido incrementando en el ámbito mundial en los últimos años, a medida que la disponibilidad del grano se reduce (Fuentes *et al.*, 2001). Esto, ha sido una buena alternativa para la utilización del rastrojo de maíz como alimento para rumiantes, pese a que posee poco valor alimenticio y baja digestibilidad debido a su estado de lignificación (Espinoza *et al.*, 2004)

Los ensilajes nos sirven para almacenar alimentos en tiempo de cosecha y escasez, conservando calidad y palatabilidad a bajo costo. Este tipo de alimentos se emplea para manejar ganado en forma intensiva semi-intensiva o estabulada por ser una excelente opción para la alimentación en las ganaderías del país por la gran variedad de forrajes que existen, la intensidad solar y el nivel de lluvias que existen, por lo que se pueden producir varias cosechas en el año (Reyes, 2013).

2.2. Situación económica actual de ganadería

Las condiciones climáticas de la región perjudican a la explotación ganadera por la escasez de alimento en determinadas épocas del año, provocando aumento de costos, la carne y leche de bovinos son los productos pecuarios de mayor importancia económica y social, pues en su producción, procesamiento y comercialización involucra gran parte del territorio nacional. Según el Instituto Nacional Autónomo Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2008), la explotación bovina de doble propósito (leche-carne), ha resultado ser más sustentable pues le proporciona al mediano y pequeño productor la liquidez necesaria en el corto plazo para el sostenimiento y desarrollo de su sistema de producción.

2.3. Alimentación ganadera en Ecuador

En nuestro país existen diversos sistemas de producción ganadera: a campo abierto, sogueo y semiestabulado, en terrenos con escasa fertilidad, con pastos poco adaptados a las condiciones climáticas de las distintas regiones, los mismos que presentan un deterioro muy visible y progresivo con baja productividad de biomasa, lo cual tiene como consecuencia una disminución significativa de la producción animal (Vera, 2004). Esta ha sido la causa más importante del desarrollo lento de la ganadería, que se ve afectada por la falta de una especie forrajera de buena calidad, que permita desde un inicio a los ganaderos implementar una producción pecuaria estable, por otro lado influyen de forma negativa los suelos pobres, frágiles y el desconocimiento de especies de plantas o subproductos de las mismas que resultan benéficas para la productividad (Paladines, 1992).

Los pastos constituyen la principal fuente de nutrimentos para la alimentación del ganado bovino, el principal atributo de los pastos es su gran capacidad para producir materia seca, lo que los hace ideales para suministrar proteína, energía, minerales, vitaminas y fibra al ganado bovino especializado en la producción de leche, así como al de doble propósito y de carne.

2.4. Alternativas de alimentación ganadera

Dentro de las alternativas de alimentación ganadera los forrajes se ofrecen en forma fresca, henificada o ensilada, dependiendo de las características particulares de cada forraje, los pastos y las leguminosas se emplean en forma henificada y las gramíneas como el maíz se conservan mediante procesos de ensilaje las cuales proporcionan alimento de buena calidad durante todo el año, aprovechar los excedentes de forrajes que se producen en determinadas épocas del año, facilitar la inclusión de subproductos agroindustriales en la alimentación de bovinos, incrementar la carga animal y mejorar el balance de la dieta. (Preston *et al.*, 1992).

En el caso de la forma fresca se utilizan varias fuentes de alimento como la caña de azúcar integral más plantas altas en proteína como leguminosa, gramíneas y otras como maní forrajero, morera, leucaena son utilizadas como alimento suplementario del ganado en pastoreo (Torres, 2015). Además el maíz se cultiva con frecuencia para producir forraje verde, muy palatable, de gran valor nutritivo ya que suele cosecharse cuando el grano se

encuentra en estado lechoso-pastoso y las hojas están todavía verdes y utilizadas como fuente de alimento en forma fresca. (Skerman, 1992).

La henificación es un método de conservación de forraje seco producido por una rápida evaporación del agua contenida en los tejidos de la planta, los procesos de producción en la confección del heno son de vital importancia, la calidad potencial estará determinada por la pastura que le dé origen, para lo cual es imprescindible partir de una pastura de calidad tomando en cuenta la composición de las pasturas, presencia de malezas en el lote, la sanidad, densidad de plantas, estadio fenológico de las pasturas al momento del corte, estructura de la planta (Cattani, 2011). Al henificar las especies forrajeras que resaltan son la Alfalfa, Trébol blanco, Trébol rojo, Avena, asociaciones de gramíneas y leguminosas (Avena-Veza; Ballico-Trébol), Pastos Estrella, muchas gramíneas de porte alto como el Maíz pueden henificarse siempre y cuando se aumente la velocidad de secado de los tallos compactos y jugosos, los cuales tardan más de 20 días en secarse. (Bustamante, 2004)

La utilización de subproductos industriales es otra alternativa de alimentación pues existe una gran variedad de subproductos residuos de cosecha como la panca de maíz, quinua y amaranto, productos del procesamiento de alimentos y de subproductos de molinería, tubérculos, raíces, frutas y subproductos de agroindustrias que son aprovechados como suplementos forrajeros, a estos se los clasifica generalmente en suplementos proteicos y suplementos energéticos, dentro de los suplementos proteicos están subproductos de la industria aceitera como la Semilla de algodón, Harina de soja, Cáscara de soja, Gluten de maíz, Semillas de girasol, Harina de girasol, Harina de cacahuete (maní), Harina de palma (palmiste), también tenemos subproductos de la industria cervecera como Hez de malta, Raicillas de cebada o brotes de malta, otros subproductos de origen animal como subproductos de la industria frigorífica como Harina de sangre, Harina de carne y hueso, subproductos de la industria avícola como cama de pollo (pollinaza), Harina de plumas, subproductos de la industria pesquera la Harina de pescado y dentro de los suplementos energéticos están los subproductos de la industria molinera entre ellos el Afrechillo de trigo, Afrechillo de arroz, subproductos de la industria frutícola, el rechazo de Banana, Pulpa de cítricos, Orujo de uva, subproductos de la industria azucarera, Melaza, Bagazo, subproductos de la industria lechera el suero, Rechazo de papa, grasas y aceites. (Loayza, 2007)

2.5. Ensilaje.

El método de ensilaje sirve para almacenar alimentos en tiempo de cosecha y suministrarlo en tiempo de escasez, conservando calidad y palatabilidad a bajo costo, también permite aumentar el número de animales por hectárea, la sustitución o complementación de los concentrados, además favorece manejar ganado en forma intensiva semi-intensiva o estabulada. Es una excelente opción para la alimentación en las ganaderías del país por la gran variedad de forrajes y se pueden producir varias cosechas en el año (Reyes, 2013).

El forraje fresco de cultivos de gramíneas, leguminosos como maíz, trigo y alfalfa, puede ser conservado por medio del ensilaje. En muchos países los forrajes ensilados son muy apreciados como alimento animal. Para producir un ensilaje de buena calidad es esencial asegurar que se produzca una buena fermentación microbiana en el ensilado. El proceso de fermentación no depende sólo del tipo y la calidad del forraje, sino también de la técnica empleada para la cosecha y para el ensilaje (Gómez, 2012).

El ensilaje es la fermentación de los carbohidratos solubles del forraje por medio de bacterias productoras de ácido láctico en condiciones anaeróbicas, el producto final es la conservación del alimento porque la acidificación del medio inhibe el desarrollo de microorganismos, la presencia de oxígeno es perjudicial para el proceso porque habilita la acción de microorganismos aerobios que degradan el forraje ensilado hasta CO_2 y H_2O , las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAC) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético, al generarse estos ácidos el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción (Merry *et al.*, 1997). El proceso del ensilaje se puede dividir en cuatro etapas:

2.5.1. Primera etapa: Fase Aeróbica

Esta fase dura pocas horas. El oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los microorganismos aerobios y aerobios facultativos como las levaduras y enterobacterias. Además, hay actividad de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas, siempre que el pH se mantenga en el rango normal para el jugo del forraje fresco pH 6,0 a 6,5. Las levaduras son microorganismos anaerobios facultativos y heterótrofos cuya presencia en el ensilaje es indeseable porque bajo condiciones anaerobias fermentan los azúcares produciendo etanol

y CO₂. La producción de etanol disminuye el azúcar disponible para producir ácido láctico y produce un mal gusto en la leche cuando se emplea para alimentar vacas lecheras. Además, en condiciones aerobias muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico en CO₂ y H₂O, lo que eleva el valor del pH del ensilaje permitiendo el desarrollo de otros organismos indeseables. Las enterobacterias son organismos anaerobios facultativos y la mayoría de las que se encuentran en el ensilaje no son patógenas, su desarrollo en el ensilaje es perjudicial porque compiten con las BAC por los azúcares disponibles y porque degradan las proteínas, esta degradación proteica causa una reducción del valor nutritivo del ensilaje y genera compuestos tóxicos como aminos biogénicas y ácidos grasos de cadena múltiple. (Holzapfel *et al.*, 1992)

2.5.2. Segunda etapa: Fase de Fermentación

Se inicia al producirse un ambiente anaerobio esta puede durar de días a semanas dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones ambientales en el momento del ensilaje, si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad BAC proliferará y se convertirá en la población predominante, debido a la producción de ácido láctico y otros ácidos el pH bajará a valores entre 3,8 a 5,0. Las bacterias que producen ácido láctico (BAC) pertenecen a la microflora epifítica de los vegetales, los componentes BAC que se asocian con el proceso de ensilaje pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, la mayoría de estos son mesófilos es decir que pueden crecer en un rango de temperaturas que oscila entre 5° y 50 °C, con un óptimo entre 25° y 40 °C, son capaces de bajar el pH del ensilaje a valores entre 4 y 5, dependiendo de las especies y del tipo de forraje, todos los miembros del BAC son aeróbicos facultativos, pero muestran cierta preferencia por la condición anaerobia. Las características del cultivo como contenido de azúcares, contenido de materia seca y composición de los azúcares, combinados con las propiedades del grupo BAC, así como su tolerancia a condiciones ácidas o de presión osmótica y el uso del substrato influirán sobre la capacidad de competencia de la flora BAC con las enterobacterias durante la fermentación del ensilaje (Hammes *et al.*, 1992).

2.5.3. Tercera etapa: Fase Estable

La mayoría de los microorganismos de la fase de fermentación lentamente reducen su presencia, algunos microorganismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo;

otros, como clostridios y bacilos, sobreviven como esporas, sólo algunas proteasas y carbohidrasas y microorganismos especializados como *Lactobacillus buchneri* que toleran ambientes ácidos, continúan activos pero a menor ritmo. Si el ambiente se mantiene sin aire ocurren pocos cambios, algunas bacterias indeseables en esta fase estable son las bacterias acidófilas, ácido tolerantes y aerobias, por ejemplo la *Acetobacter spp.* es pernicioso en el ensilaje porque puede iniciar una deterioración aeróbica, ya que puede oxidar el lactato y el acetato produciendo CO₂ y agua, el género *Clostridium* es anaerobio, forma endosporas y puede fermentar carbohidratos y proteínas, por lo cual disminuyen el valor nutritivo del ensilaje, crea problemas al producir aminos biogénicos. Los *Bacillus spp* son bacterias aerobias facultativas que forman esporas, fermentan un amplio rango de carbohidratos produciendo ácidos orgánicos entre ellos acetatos, lactatos y butiratos o etanol, butanodiol o glicerol. (Berkeley, 1986)

Algunas especies de *Bacillus* producen sustancias fungicidas y se los ha utilizado para inhibir el proceso de deterioro aeróbico en ensilajes (Phillip; Fellner, 1992) pero con excepción de estas especies, el desarrollo de los *Bacillus* en el ensilaje es considerado como indeseable porque son menos eficaces como productores de ácido láctico y acético comparado con el grupo BAC y que en la etapa final incrementan el deterioro aerobio (Lindgren, *et al.*, 1985).

2.5.4. Cuarta etapa: Fase de Deterioro Aerobio

Ocurre en todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire para su empleo, pero puede ocurrir antes por daño de la cobertura del silo provocados por roedores o pájaros, el período de deterioro puede dividirse en dos etapas la primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético lo cual aumenta el valor del pH permitiendo el inicio de la segunda etapa de deterioro donde se constata un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, también incluye la actividad de otros microorganismos aerobios, también facultativos, como mohos y enterobacterias (Honig; Woolford, 1980), los mohos son organismos aerobios cuya presencia en el ensilaje se detecta por la aparición de filamentos de diversos colores, se desarrollan en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno, inclusive trazas, en un buen ensilaje eso ocurre sólo al inicio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior de la masa ensilada, pero durante la fase del deterioro aerobio todo el ensilaje puede ser

invadido por mohos disminuyendo el valor nutritivo, la palatabilidad del ensilaje y son un riesgo para la salud de los animales y las personas (Frevel; Engel, 1985).

2.6. Tipos de silos.

Existen varios tipos de silos que se diseñan conforme a las necesidades de alimentación, los tipos de silos más abundantes son simplemente montones, además hay silos de torre, tipo bunker, fundas horizontales de plástico y grandes rollos (López; Ortega, 2006). Aéreos o de torre. Son poco comunes por los elevados costos de construcción. Se fabrican con diferentes materiales como ladrillo, bloques de cemento, cemento armado, piedra, láminas metálicas, entre otros. Tienen techo que proporciona una buena protección contra la lluvia. Con relación a otros silos, presenta una mejor compactación del forraje, menores pérdidas superficiales del ensilaje pero producen mayores pérdidas por jugos exprimidos. Estos silos además de costosos, requieren maquinaria complicada para llenarlos y vaciarlos (Caraballo, 2012).

Subterráneos o de trinchera. Su construcción resulta más barata que la de los silos de torre. Se cargan y descargan fácilmente usando otro tipo de maquinaria. Hay menor pérdida por jugos exprimidos, pero por la mayor superficie expuesta a condiciones ambientales, pueden aumentar las pérdidas. Se necesita de buena experiencia para llenarlo y lograr una buena expulsión del aire, la cual depende de la distribución del forraje, de la compactación y del tapado o sellado (Caraballo, 2012).

Horizontal (tipo Bunker). Son los más utilizados por la facilidad de construcción. Existen los silos bunker tradicionales con paredes y piso de concreto, que minimizan las pérdidas durante la fermentación, pero incrementan los costos. Aunque pueden presentar altas pérdidas, el control que se logra durante el llenado y tapado, las reducen al mínimo (Caraballo, 2012).

Horizontal de montón. Son hechos directamente sobre la tierra, no poseen paredes, el forraje se acumula en forma circular o trapezoidal; el piso puede ser la misma tierra, estar cementado o cubierto por un plástico. En la medida que el forraje se va acumulando se compacta mediante pisoteo o se utiliza un pisón, un rodillo u otro equipo. Una vez finalizado el proceso se cubre con plástico y se colocan materiales pesados encima para ayudar a la compactación (Caraballo, 2012).

De vacío (de bolsa). Consiste en colocar el material que se va a ensilar dentro de bolsas de plástico calibre 4 - 6 y capacidad de 30 - 40 kilogramos después de extraer mediante una adecuada compactación la mayor cantidad posible de aire, se deben cerrar herméticamente (Caraballo, 2012).

2.7. Ensilaje de maíz.

El ensilaje de maíz sirve como un forraje de alta energía, para el ganado, importante para hatos de alta producción y en establos que experimentan problemas para elaborar o comprar cosechas de heno de alta calidad, su alto contenido de energía, también se adapta para ser usado en raciones de bajo costo. El ensilaje de maíz requiere menos trabajo para producir una tonelada de forraje que muchos otros cultivos forrajeros, además se puede prolongar el período de cosecha para toda la superficie sembrada y provee una oportunidad para salvar cosechas estresadas o dañadas, también puede reciclar los nutrientes de las plantas eficientemente especialmente grandes cantidades de N y K, sin embargo, el ensilaje de maíz tiene algunas desventajas como por ejemplo su venta y transporte lejos, el ensilaje de maíz puede también llevar a un incremento en el potencial de erosión del suelo y consecuentemente una pérdida en la productividad del suelo cuando las prácticas de conservación del suelo no son parte del sistema de producción (Villa, 2008).

2.8. Aditivos para ensilaje.

Estos aditivos sirven para varios propósitos estos se clasifican de acuerdo a sus funciones en: estimulantes e inhibidores de la fermentación, inhibidores de la deterioración aeróbica, de los nutrientes y absorbentes, además pueden ser biológicos o químicos; existe una gran lista de aditivos disponibles los cuales vienen en una variedad de formas: líquidos, sólidos o suspensión y se pueden aplicar durante la cosecha/picado o en el llenado de los silos (Weinberg y Ashbell, 2003; Slottner y Bertilsson, 2006), también se han utilizado diversos aditivos durante el ensilaje para manipular la dinámica de fermentación (Cavali *et al.*, 2006), inhibiendo el desarrollo de microorganismos indeseables para la fermentación (Santos *et al.*, 2009), los aditivos se usan con el propósito de reducir las pérdidas y aumentar la recuperación de carbohidratos solubles mediante la inhibición de la fermentación y la producción de ácido láctico (Suarez; Zarate, 2013).

Los aditivos se clasifican en aditivos inhibidores como bactericidas, acidificantes, protectores de sustratos, y trampas de oxígeno, aditivos absorbentes, aditivos saborizantes y aditivos estimulantes entre estos están sustratos, inoculantes, enzimas, *Bacillus*. (Cussen, 1995), Los residuos fibrosos de cosechas agrícolas de arroz, caña, maíz y otros cultivos tienen como limitación su elevado contenido de fibra y sus bajos niveles de nitrógeno y carbohidratos solubles (Ensminger, 1992), lo que afecta el comportamiento animal razón por la cual se han sugerido diferentes sistemas para mejorar el valor nutritivo de estos residuos, entre los que se encuentra el empleo de inoculantes microbianos en ensilajes, también se utilizan aditivos acidificantes, bacteriostáticos y estimuladores de la fermentación láctica, así como presecados o mezclas de gramíneas y leguminosas. (Berto; Frenzel 1997).

2.8.1. Inoculantes

Estos contienen bacterias productoras de ácido láctico que se agregan a la población bacteriana natural para ayudar a garantizar una fermentación rápida y eficiente en el silo (Muck y Kung Jr, 1997) en la investigación efectos de enzimas e inoculantes sobre la composición del ensilaje de maíz realizada por (Ruiz, 2009) menciona que la inoculación con BAL presentes en Sill All 4x4™ que contienen (*Lactobacillus plantarum*, 12,6x10⁹ UFC/g, *Pediococcus acidilacti* 4,2x10⁹ UFC/g, *Enterococcus faecium* 2,1x10⁹ UFC/g, *Bacillus salivarus* 2,1x10⁹ de UFC/g y β-glucanasas; Alltech, U.S.A) (SA), y de Biosile™ que contiene (*L. plantarum* y *P. pentosaceus* 9x10⁹ UFC/ g; Hansen, U.S.A) (SA y BS), incrementó significativamente ($p < 0,05$) los contenidos de FDN en el ensilaje de maíz.

2.8.2. Enzimas

Son otro tipo de aditivos las cuales contienen una gran variedad de proteínas que pueden actuar degradando los carbohidratos estructurales de las plantas, así como el almidón que se encuentra en los granos lo cual mejora la fermentación y la utilización por el animal (Muck; Bolsen, 1991). De acuerdo con (Nadeau *et al.*, 2000) el efecto más consistente de las enzimas degradadoras de pared celular, como las celulasas y hemicelulasas es reducir la concentración de los carbohidratos estructurales. Esta baja concentración de pared celular está asociada con mayores consumos de materia seca y por ende en una mejoría del comportamiento animal. Al respecto, (Hristov; McAllister 2002) notaron que al agregar estas enzimas se presentaba una mejor preservación del forraje ensilado, una alta

concentración de azúcares solubles y una mayor degradabilidad ruminal. Además, otros autores como (Dean *et al.*, 2005) mostraron que la aplicación de enzimas fibrolíticas podía aumentar la digestibilidad, fermentación y estabilidad aeróbica del ensilaje del pasto bermuda atribuyendo este efecto a la acción sinérgica de celulasas y hemicelulasas.

2.8.3. *Bacillus spp.*

Dentro de las especies de bacterias que se pueden utilizar como aditivos microorganismos podemos encontrar el género *Bacillus spp.* según (Bortolozzo; Kira. 2002) los *Bacillus spp.* en la actualidad son uno de los microorganismos más utilizados, los mismos son clasificados como transitorios del tracto gastrointestinal, pues no poseen la capacidad de adherirse al epitelio intestinal, su función es la de multiplicarse y favorecer la colonización de los *Lactobacillus* y fortalecer el sistema inmune.

Las bacterias del género *Bacillus spp.* según (Jawets, 1996) microbiológicamente son considerados como Gram positivos en general, aunque algunas especies presentan reacción negativa, son aerobios, anaerobios facultativos y aerotolerantes, no son adherentes, son productoras de sustancias antimicrobianas, producen enzimas hidrolasas, reacción positiva a la catalasa, hidroliza la gelatina, fermentan algunos azúcares y en ocasiones producen gas, usualmente descomponen las proteínas produciendo amonio, se encuentran comúnmente en el suelo e incluso en el conducto intestinal de los animales, en algunos alimentos, ciertos miembros de dicho género han adquirido importancia como productores de antibióticos y para la elaboración de productos biopreparados como aditivos en la alimentación animal y humana (Casula; Cutting, 2002) mencionan que las bacterias de este género se agrupa en la familia *Baillaceae* y las especies tipos son: *Bacillus subtilis*, *licheniformis*, *cereus*, *megaterium*, *macerans*, *polymyxa*, *thuringiensis*, *pasterii*, *fastidiosus*, *sphaericus* y *anthracis*.

Según (Anon, 1998) La FDA (Food & Drug Administration) y la AAFCO (Association of American Feed Control Officials) reconocen a las siguientes especies del género *Bacillus* como microorganismos GRAS: (generalmente reconocidos como seguros) *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*.

La producción de endosporas es una característica típica de todas las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. También menciona que el empleo de las bacterias del género *Bacillus* y sus esporas viene dado por su capacidad para la producción de enzimas.

Estas además de mejorar la digestión en el hospedero, son capaces de inhibir el crecimiento microbiano de bacterias dañinas y las esporas estimulan el sistema inmune contribuyendo a la resistencia contra el desafío de patógenos ambientales, dentro de las enzimas microbianas con interés industrial resaltan, las obtenidas a partir de cepas de *Bacillus*, debido a la bioseguridad que brindan estos microorganismos entre estas se encuentran las proteasas, amilasas y glucosidasas que descomponen las complejas moléculas de los alimentos y las transforman en nutrientes más simples. Estos compuestos son absorbidos más rápidamente por el animal o pueden ser empleados por otras bacterias beneficiosas para el establecimiento de una microflora intestinal balanceada.

Según (McConell; Tannock, 1997) dentro de la actividad enzimática específica de algunas de las especies de *Bacillus* se citan: producción de proteasa, amilasa, β - glucanasa y otras enzimas, el *B. subtilis*, produce proteasa, amilasa y otras enzimas, el *B. licheniformis* y produce β - glucanasa la especie de *B. coagulans*. (Bhat; Hazlewood, 2001) resalta que la actividad fibrolítica, está dada por las enzimas producidas por *Bacillus*, como parte de la acción para mejorar la degradabilidad de sustratos lignocelulósicos. Las enzimas necesarias para hacer esta degradación se pueden dividir principalmente en: las celulasas (Endoglucanasas, Exoglucanasas, β -glucosidasa), hemicelulasas (β -1,4-endoxilanasas, β -xilosidasa, α -L-arabinofuranosidasa, α -glucuronidasa, acetil xilan esterasa y ácido fenólico esterasa (ácido ferúlico y p-cumarico)).

La adición de *Bacillus licheniformis* según (Qiao *et al.*, 2008) menciona que presento diferencias significativas en MO, PC, FDN y FDA con comparación a la adición de *Bacillus subtilis*, además puntualiza que dentro de la fermentación ruminal y síntesis de proteínas microbianas la concentración de Nitrogeno amoniacal ruminal en todos los puntos de muestreo después de la alimentación matutina fue menor, en las vacas que recibieron suplementación con *B. licheniformis*, la concentración de Nitrogeno de amoniaco ruminal fue mayor al de vacas que recibieron suplementación de *B. subtilis*, menciona también que hubo una tendencia que las vacas alimentadas con la suplementación de *B. licheniformis* tuvieran un valor de pH menor y la suplementación de *B. subtilis* no tuvo efecto sobre el pH ruminal, la suplementación con *B. subtilis* no tuvo efecto significativo sobre la producción de AGV total, la suplementación con *B. subtilis* no aumentó el flujo de nitrógeno, amoníaco y el flujo microbiano.

(Hillal *et al.*, 2011) menciona que la adición de probióticos con *B. subtilis* y *B. licheniformis*. en la dieta tuvo un efecto benéfico sobre el pH ruminal, mejorando así la degradabilidad de la fibra y facilitando un aumento en el consumo voluntario de materia seca. La b-mananasa (β -1,-D-manan endo-1,4, β - mananohidrolasas; EC 3.2.1.78), es una glicoproteína que cataliza la hidrólisis alrededor de los enlaces β -D-1,4- manopiranosil en β -mananos produciendo oligosacáridos (McClery *et al.*, 1976). Estas enzimas aparentemente tienen diferentes modos de acción hidrolíticas sobre los heter-b-mananos; los productos más comunes de hidrólisis son manotriosas y manobiosas (Ooi y Kikuchi, 1995). Estos oligosacáridos subsecuentemente pueden ser hidrolizados por β -manosidasas (EC 3.2.1.25) para producir manosa. Algunas β -mananasas presentan actividades de transglucosilación sobre algunos manooligosacáridos (Harjunpää *et al.*, 1995). Altos contenidos de mananos, galactomananos y glucomananos se utilizaron para la reducción de fibra cruda, y favorecer la digestibilidad de los alimentos balanceados para los animales (McNaughton *et al.*, 1998).

- **Xilanasas**

La mayoría de los residuos agrícolas contienen tres componentes mayores que son celulosa, hemicelulosa y lignina. El xilano es el componente principal de la hemicelulosa; debido a la heterogeneidad del xilano, su hidrólisis requiere de la acción de un complejo sistema enzimático. Este complejo está usualmente compuesto por β -1,4 endoxilanasas, β -xilosidasas, α -arabinofuronosidasa, α -glucuronidasa, acetilxilano esterasa ácido fenol esterasa (Sunna *et al.*, 1996; Breccia *et al.*, 1998). Todas estas enzimas actúan cooperativamente para convertir el xilano en azúcares constituyentes. Los sistemas enzimáticos xilanolíticos están ampliamente distribuidos en bacterias y hongos (Wong *et al.*, 1988; Lagunas, 2004).

- **Celulasas**

Son glicosil hidrolasas o glucohidrolasas, las cuales hidrolizan oligosacáridos y polisacáridos de glucosa unidos por enlaces β -1,4. En general tres tipos de enzimas forman los sistemas celulolíticos: primero endocelulasas (endoglucanasas o 1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas; E.C. 3.2.1.4), segundo exocelulasas (celulosa 1,4- β -D-celobiosidasas o 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas; E.C. 3.2.1.91) y tercero β -D-glucosidasas (β -D-glucosido glucohidrolasas; E.C. 3.2.1.21) (Hernandez- Santoyo *et al.*, 1999).

CAPÍTULO III

3.1. HIPÓTESIS

La adición de *Bacillus spp.* en el ensilaje de maíz ayuda a desdoblar la pared celular y con ello, incrementa la digestión de los nutrientes, mejora la fermentación ruminal *in vitro* y disminuye la producción de gas *in vitro*

3.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la adición de *Bacillus spp.* en el ensilaje de maíz sobre la cinética de degradación ruminal *in situ* de los nutrientes, fermentación ruminal y producción de gas *in vitro*.

3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar efecto de la adición de *Bacillus spp.* en el ensilaje de maíz sobre la cinética de degradación ruminal *in situ* de los nutrientes.
- Evaluar el efecto de la adición de *Bacillus spp.* en el ensilaje de maíz sobre la digestibilidad, ácidos grasos volátiles, pH, nitrógeno amoniacal en el rumen y producción de gas *in vitro*.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del experimento

El siguiente ensayo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicada en el sector Querochaca, en la Parroquia La Matriz del cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Con las coordenadas geográficas 1°25'0" Sur (latitud), 78°36'20" Oeste (longitud), a una altitud de 2865msnm.

4.2. Equipos y Materiales

4.2.1. Equipos

- Tanque de CO₂
- Molino de martillo
- Transductor de presión (DO 9704, Delta OHM, Italia)
- pH-metro (BANTE-221 portable pH/ORP Meter)
- Analizador Ankom Technology 2000
- Balanza analítica
- Balanza digital
- Estufas
- Picadora de forraje
- Baño de María
- Desecadora
- Cromatógrafo de gases
- Espectrofotómetro
- Leco corporation
- Computadora portátil

4.2.2. Materiales

- Establo
- Baldes de 14 L.
- Tamiz (1 mm)
- Licuadora
- Jeringas de 5, 10, 20 y 60 ml.
- Papel filtro

- Bolsas de nylon (0.42 μ)
- Bolsas plásticas (10 kg)
- Fundas plásticas de 5 lb
- Saca de 1m³
- ACTIMAX (inoculo de *Bacillus spp.*)
- Frascos de vidrio color marrón de 100 ml.
- Crisoles
- Pinzas
- Vasos de precipitación
- Matraces aforados
- Imanes
- Guantes de látex
- Guantes de ginecología bovina.
- Botas
- Overol
- Frascos plásticos de 20 ml
- Tubos Eppendorf de 2 ml
- Ensilaje de rastrojo de maíz

4.3. Factores en estudio

4.3.1. Preparación de los silos y tratamientos

El corte de la planta de maíz se realizó cuando la misma se encontraba en su estado fenotípico de producción de choclo; es decir que la mazorca estaba aún en estado pastoso-lechoso. El corte se realizó en el tallo a 5 cm del suelo, la cosecha se la realizó de forma manual con ayuda de un machete. Posteriormente se procedió a picar la planta de maíz a un tamaño de partícula de 13 mm, se elaboró una saca de 1m³, donde se colocó el material picado, lo cual sirvió para determinar cuántos Kg de Materia Fresca de rastrojo de maíz picado contiene 1 m³, gracias a este procedimiento se determinó que 1m³ contiene 296.3 Kg de MF de rastrojo de maíz picado a 13 mm. A partir de este material se determinó el contenido de Materia Seca (MS) expresado en Kg que contiene 1 m³ de MF (80 Kg MS/m³), estos resultados se utilizaron para calcular la cantidad de MF/Kg de MS (3.7 Kg de MF/Kg MS) y las dosis de *Bacillus spp.* puesto que la dosis recomendada por ACTIMAX[®] (inoculo de *Bacillus spp.*) según especificación menciona que la máxima dosis para herbáceas es de 100 ml/m³ de MF, lo cual equivalió a 1.5 ml del inoculo por Kg

de MS gracias a los resultados obtenidos se establecieron los ensilajes con sus respectivas dosis (tratamientos) del inoculo *Bacillus spp.*

Posteriormente se prepararon 16 micro silos tipo bolsa cada uno con 1 kg de MS (3.7 kg de MF) a los que se le añadieron las siguientes dosis (tratamientos) 0; 1.5; 3 y 4.5 ml del inoculo de *Bacillus spp./Kg MS*, y se ensilaron por 30 días. Terminado los 30 días se abrieron los silos para determinar el pH y temperatura de cada uno, posteriormente se tomaron 900g de cada ensilaje de rastrojo de maíz de cada tratamiento y se colocaron en fundas de papel para determinar la MS en una estufa a 60 °C de temperatura hasta obtener peso constante. Luego de secadas las muestras se molieron en un molino de martillo con tamaño de criba de 2 mm. Una vez molido se pasaron por un tamiz de 1 mm, uniformizado así el tamaño de partícula y realizar los análisis tanto *in vivo* como *in vitro*.

4.4. Variables respuesta

4.4.1. Degradación ruminal de nutrientes *in situ*

La degradación ruminal *in situ* de los nutrientes se estimó siguiendo la metodología de la bolsa de nylon (0.42 μ) en el rumen descrita por (Orskov, Hovell, & Mould, 1980). Se utilizaron 6 bovinos machos castrados, con un peso de aproximadamente 450 kg, de raza mestiza, provistos de una fistula con cánula en el rumen. Los animales se los alimento con una dieta a base de forraje de alfalfa. Los toros se alojaron en corrales individuales con acceso al alimento y agua *ad libitum*. En cada bolsa (n=12/tratamiento) 4 g de MS se incubaron en el rumen a los siguientes tiempos 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 horas, luego de las 96 horas se retiraron las bolsas, se lavaron con agua corriente y se secaron en una estufa a 60 °C de temperatura hasta obtener peso constante, posterior se realizó el análisis del contenido de nutrientes. Para estimar las constantes de degradación ruminal de los nutrientes se utilizó el programa (GraphPad Prism versión 7. 2016) que ajusta los datos en la ecuación exponencial para la cinética de degradación ruminal de nutrientes ecuación (i) y la degradación efectiva ecuación (ii) descritas por Orskov y McDonald (1979).

$$Y = a + b (1 - e^{-ct}) \quad (i)$$

$$\text{Degradabilidad efectiva} = a + ((b * c) / (c + k)) \quad (ii)$$

Dónde:

Y = Porcentaje de degradación acumulada en un tiempo t %.

a = Intercepto de la curva de degradación cuando t=0 (de degradabilidad inicial %)

b = Fracción potencialmente degradada en el rumen

c = Tasa de degradación, (% horas).

t = Tiempo de incubación en el rumen, (horas).

e = Base de los logaritmos naturales

k = tasa de flujo de las partículas del rumen

4.4.2. Producción de gas *in vitro* y digestibilidad *in vitro*

Para estas pruebas, el contenido del rumen (líquido y la fracción sólida) se obtuvo de forma separada de cada toro (3 toros). El contenido ruminal se colectó en fundas plásticas antes de la alimentación en la mañana, las mismas se colocaron en recipientes plásticos (baldes) con agua caliente a temperatura controlada (39 °C) y se los transportó al laboratorio para ser procesados dentro de la primera hora de la recolección. El medio rico en nitrógeno (saliva artificial) se preparó según lo descrito por Menke y Steingass, (1988) que consistió en la preparación de una solución búfer a base de Bicarbonato de Sodio y Bicarbonato de Amonio, así también una solución de macrominerales a base de Fosfato de Sodio, Fosfato de Potasio y Sulfato de Magnesio, adicionalmente se preparó una solución reductora a base Cisteína, también se aplicaron microminerales, un indicador y a un bajo flujo continuo de CO₂ durante una hora y media en baño maría a una temperatura de 39.5 °C. La producción de gas se realizó mediante la técnica descrita por Theodorou et al. (1994), la cual consiste en colocar 0.500 mg de MS de muestra (tratamientos experimentales) en botellas de vidrio con capacidad de 100 ml. En las botellas se incubó 60 ml del inóculo (70:30 medio; saliva artificial/inóculo; contenido ruminal) bajo flujo de CO₂ continuo. Las botellas se incubaron a 39.5 °C en una estufa. La medición de la presión de gas y el volumen se midió manualmente a los siguientes tiempos 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 96 horas, con ayuda de un transductor de presión (DO 9704, Delta OHM, Italia) y jeringas plásticas. Para cada tratamiento se utilizaron 6 botellas que por tratamiento en cada tiempo y tres botellas adicionales como blancos. Para la digestibilidad *in vitro* se utilizó el mismo procedimiento antes mencionado, pero solo se incubó hasta las 48 horas. Posterior a la incubación se filtró el contenido de cada frasco con ayuda de papel filtro y se secó en una estufa a 60 °C de temperatura hasta obtener peso constante para estimar la digestibilidad

MS, posteriormente se colocaron las muestras filtradas y secadas en crisoles en una mufla a 600 °C de temperatura durante 6 horas para estimar la digestibilidad de MO.

4.4.3. pH ruminal

Bajo el mismo procedimiento antes mencionado para la producción de gas *in vitro* se prepararon 100 frascos de vidrio, que sirvió para coleccionar muestras de contenido ruminal en los siguientes tiempos de incubación 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. De cada frasco (n=5 tratamiento) de cada tiempo y cada tratamiento se midió el pH ruminal con ayuda de un pH-metro (BANTE-221 portable pH/ORP Meter).

4.4.4. Análisis químicos

La Materia Seca (#7.007), Nitrógeno (#2.057), y ceniza (#7.009) será determinar según la metodología descrita por AOAC (1990). La Fibra Detergente Neutra y la Fibra Detergente Ácida se determinaron mediante el método 13 y 12 respectivamente del analizador Ankom Technology 2000. Los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Ryan (1980) usando un cromatógrafo de gases. El Nitrógeno Amoniacal (N-NH₃) se determinó mediante una técnica colorimétrica usando un espectrofotómetro según la metodología descrita por Barros-Rodríguez et al. (2015). La proteína cruda se la determino mediante análisis elemental de Nitrógeno (N) usando un Leco corporation.

4.5. Diseño experimental y análisis estadísticos

Se realizó un diseño completamente al azar, con cuatro tratamientos (dosis de *Bacillus spp.*) y seis repeticiones. Todas las variables se analizaron según el diseño planteado utilizando el PROC GLM del SAS (2009). Todas las medias fueron analizadas mediante la prueba de Tukey. Adicionalmente se realizó una transformación polinomial de los datos para observar si la respuesta a los tratamientos es lineal, cuadrática o cúbica.

CAPÍTULO V

5.1. RESULTADOS

5.1.1. Análisis Químico

En la composición química del rastrojo de maíz ensilado con *Bacillus spp.* hasta los 30 días con respecto a la materia seca (MS) y materia orgánica (MO) no presentaron diferencia entre tratamientos, en el caso de la fibra detergente neutra (FDN) ($P=0.0471$) en los tratamientos T3 (46.5%) y T4 (43.3%) fue menor en comparación al resto de tratamientos, observándose una respuesta lineal ($P=0.0187$) a medida que incrementa la dosis de los *Bacillus spp.* La fibra detergente ácida (FDA) en el T4 (22.6%) fue menor al resto de tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química del rastrojo de maíz ensilado con *Bacillus spp.* hasta los 30 días.

	TRATAMIENTOS				EEM	P	Contrastes		
	T1	T2	T3	T4			L	C	Cu
MS	950.0a	970.1a	960.0a	960.2a	23.54	0.2673	0.3762	0.1978	0.2582
MO	927.1a	922.7a	921.6a	923.9a	36.20	0.3910	0.2871	0.2671	0.3810
FDN	524.2a	480.0a	465.2ab	433.4b	19.76	0.0471	0.0187	0.3723	0.2241
FDA	270.6a	273.1a	282.2a	226.2b	20.32	0.0683	0.1732	0.1836	0.1362

MS: materia seca, MO: materia orgánica, FDN: fibra detergente neutra, FDA: fibra detergente ácida, T1: rastrojo de maíz ensilado con 0 ml/kgMS, T2: rastrojo de maíz ensilado con 1.5 ml/kgMS, T3: rastrojo de maíz ensilado con 3.5 ml/kgMS y T4 rastrojo de maíz ensilado con 4.5 ml/kgMS de *Bacillus spp.*

5.1.2. Degradación ruminal de nutrientes *in situ*

La degradación ruminal de la MS en la fracción soluble (a) no mostró diferencias ($P=0.4567$) entre tratamientos. La fracción insoluble pero potencialmente degradable (b) fue mayor ($P=0.0002$) en T3 (45%) y T4 (44%) con respecto a los demás tratamientos, observándose una respuesta lineal ($P=0.0001$) y cúbica ($P=0.0091$) a medida que incrementa la dosis de *Bacillus spp.* en el ensilaje de rastrojo de maíz. La tasa de degradación en % por hora (c) mostró una disminución lineal ($P=0.0101$) y cúbica ($P=0.0085$) al incrementar los niveles de *Bacillus spp.* en el ensilaje, obteniendo mayor ($P=0.0043$) tasa (c) de degradación T1 y T2 (0.029 y 0.032 %h respectivamente). En la Figura 1 (A) se observa la cinética de degradación ruminal de la MS. La degradación efectiva con las diferentes tasas de pasaje (k) no mostró diferencias ($P>0.05$) entre tratamientos. (Tabla 2).

En la Figura 1 (B) y Tabla 2 se muestra la cinética de degradación ruminal de la MO, la fracción soluble (a) fue mayor ($P<.0001$) en T1 (37%), T2 (39%) y T4 (38%) con relación al T3, observándose una respuesta cúbica ($P<0.0001$) a los tratamientos. La fracción insoluble pero potencialmente degradable (b) fue mayor ($P<.0001$) en T3 (45%) y T4 (44%) con respecto a los demás tratamientos, mostrando una respuesta lineal ($P0.0002$) y cúbica ($P<.0001$) a medida que incrementa la dosis de *Bacillus spp.* en el ensilaje de rastrojo de maíz. La tasa de degradación en % por hora (c) no mostró diferencias entre tratamientos ($P=0.9385$). La degradación efectiva con las diferentes tasas de pasaje (k) fue mayor ($P>0.05$) en T2 y T4 con relación a los demás tratamiento, obteniendo una respuesta lineal ($P<0.05$) y cúbica ($P<0.05$) al 0.02 y 0.05 ($k/\%h$), y con respecto a 0.08 ($k/\%h$) mostró una respuesta cubica ($P<.0001$) a los tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Degradación ruminal *in situ* de MS, MO y FDN (g/kg excepto donde se señala lo contrario) de rastrojo de maíz ensilado con *Bacillus spp.* hasta los 30 días.

	TRATAMIENTOS				EEM	P	CONTRASTES		
	T1	T2	T3	T4			L	C	Cu
Degradación MS									
a	400.8a	398.9a	396.5a	405.7a	4.07	0.4567	0.5046	0.1916	0.5230
b	404.0b	408.4b	451.9a	440.5a	7.29	0.0002	0.0001	0.2935	0.0091
c	0.029ba	0.032a	0.025b	0.025b	0.0014	0.0043	0.0101	0.2375	0.0085
DE 0.02 k	641.0a	651.9a	647.9a	653.6a	4.54	0.2428	0.1114	0.5777	0.2453
DE 0.05 k	548.0a	560.3a	548.0a	555.5a	4.33	0.2209	0.8514	0.7661	0.0429
DE 0.08 k	509.2a	517.5a	505.1a	513.0a	4.10	0.2053	0.9657	0.9680	0.0368
Degradación MO									
a	378.3a	394.0a	358.8b	386.6a	4.00	<.0001	0.5769	0.1457	<.0001
b	427.5bc	408.3c	459.7a	444.6ba	5.16	<.0001	0.0002	0.6969	<.0001
c	0.032a	0.033a	0.032a	0.032a	0.0015	0.9385	0.9054	0.8734	0.5542
DE 0.02 k	641.2b	647.6ba	641.4b	662.0a	3.90	0.0035	0.0042	0.0821	0.0356
DE 0.05 k	545.0bc	556.0ba	538.2c	562.2a	3.60	0.0006	0.0484	0.0857	0.0003
DE 0.08 k	500.4b	513.1a	490.3b	515.6a	3.15	<.0001	0.1220	0.0613	<.0001
Degradación FDN									
a	17.8a	41.2a	29.1a	34.2a	6.05	0.0776	0.1870	0.1466	0.0664
b	679.0a	664.6a	692.0a	696.8a	10.82	0.1832	0.1110	0.3848	0.1981
c	0.0296a	0.0290a	0.0290a	0.0295a	0.00118	0.9680	0.9258	0.6282	0.9752
DE 0.02 k	423.7a	432.7a	437.6a	448.3a	7.86	0.1989	0.0367	0.9125	0.7822
DE 0.05 k	271.0a	283.6a	282.8a	291.9a	5.96	0.1345	0.0307	0.7754	0.3931
DE 0.08 k	201.8a	216.8a	213.2a	221.3a	5.13	0.0769	0.0262	0.5134	0.2024

^{ab,c} Medias con la misma letra en una fila no difieren $P=0.05$. T1: rastrojo de maíz ensilado con 0 ml/kgMS, T2: rastrojo de maíz ensilado con 1.5 ml/kgMS, T3: rastrojo de maíz ensilado con 3.5 ml/kgMS y T4 rastrojo de maíz ensilado con 4.5 ml/kgMS de *Bacillus spp.*, EEM: error estándar de la media. a, b, and c parámetros de la ecuación que describen la degradación ruminal *in situ* de: $y = a + b(1 - e^{-ct})$, DE: degradación efectiva, k: tasa de pasaje h^{-1} , L: lineal, C: cuadrático, Cu: cúbico

La cinética de degradación ruminal de la FDN (Figura 1C) en la fracción soluble (a), fracción insoluble pero potencialmente degradable (b) y tasa de degradación en % por hora (c) no mostraron diferencias entre tratamientos ($P>0.05$). Con respecto a la degradación efectiva con las diferentes tasas de pasaje (k) no mostraron diferencias ($P>0.05$) entre los tratamientos, sin embargo, se observó una respuesta lineal ($P<0.05$) en cada una de las

tasas de pasaje a medida que incrementa la dosis de *Bacillus spp.* en el ensilaje de rastrojo de maíz (Tabla 2).

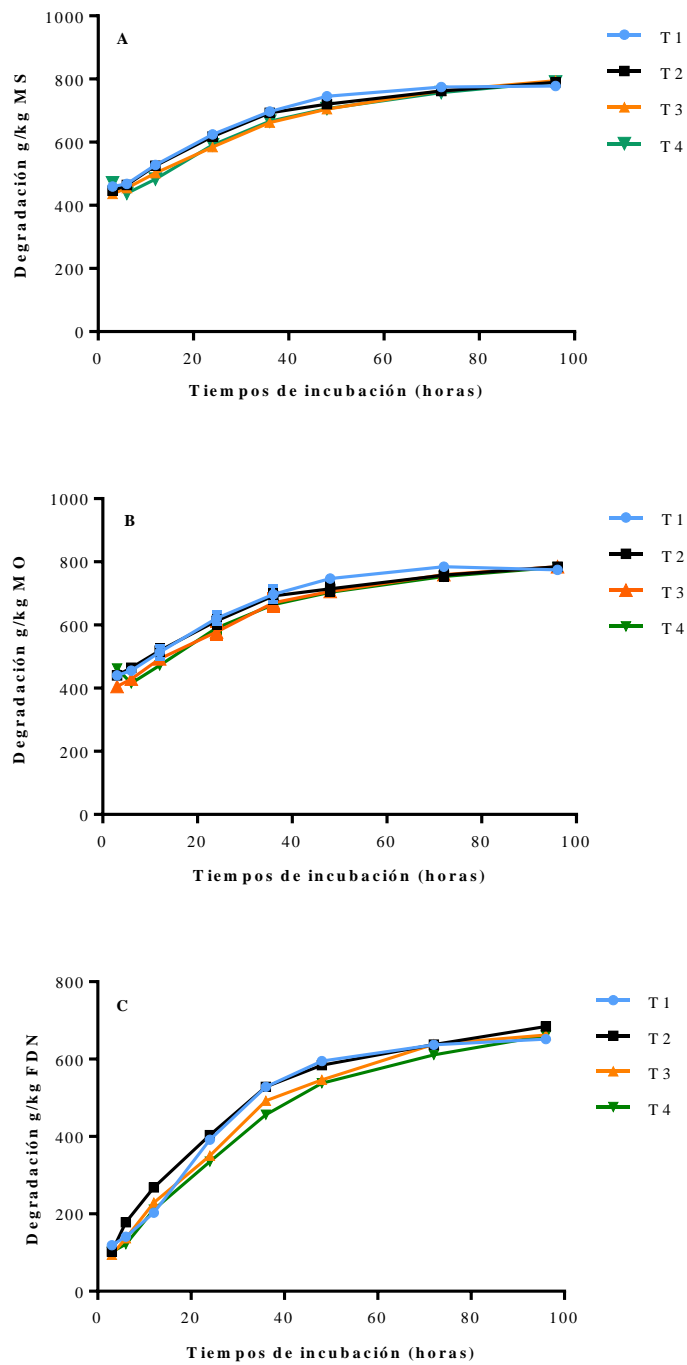


Figura 1. Cinética de degradación ruminal *in situ* de la MS (A), MO (B) y FDN (C) del rastrojo de maíz ensilado con *Bacillus spp.* hasta los 30 días.

5.1.3. Producción de gas *in vitro*

El la Figura 2 y Tabla 3 se muestra la cinética de producción de gas (PG) (ml/0.5g MS degradada). La PG fue menor ($P=0.0032$) en los tratamientos T3 y T4 obteniendo aproximadamente 36 ml/0.5g MS degradada menos gas que los demás tratamientos observándose una reducción lineal ($P=0.0005$) de gas a mayor dosis de *Bacillus spp.* en el ensilaje de maíz. La asíntota de producción de gas ($B1$) y velocidad de producción de gas ($C1$) no mostraron diferencia entre tratamientos ($P>0.05$). con respecto a las horas de producción de gas entre la hora 3 y la hora 48 no se observó diferencia entre tratamientos ($P>0.05$). Sin embargo, a partir de la hora 60 hasta el final de la incubación 96 h. se observó menor ($P>0.05$) producción de gas en los tratamientos con mayor dosis de *Bacillus spp.* en el rastrojo de maíz ensilado (lineal; $P<0.05$, Tabla 3).

El la Figura 3 y Tabla 4 se muestra la cinética de producción de gas (PG) (ml/0.5g MS fermentada). La PG fue menor ($P=0.0011$) en los tratamientos T3 y T4 obteniendo aproximadamente 54 ml/0.5g MS fermentada menos gas que los demás tratamientos observándose una reducción lineal ($P<.0001$) de gas a mayor dosis de *Bacillus spp.* en el ensilaje de maíz. La asíntota de producción de gas ($B1$) y velocidad de producción de gas ($C1$) no mostraron diferencia entre tratamientos ($P>0.05$). con respecto a las horas de producción de gas entre la hora 3 y la hora 36 no se observó diferencia entre tratamientos ($P>0.05$). Sin embargo, a partir de la hora 48 hasta el final de la incubación 96 h. se observó menor ($P>0.05$) producción de gas en los tratamientos con mayor dosis de *Bacillus spp.* en el rastrojo de maíz ensilado (lineal y cuadrática; $P<0.05$, Tabla 4).

5.1.4. Digestibilidad *in vitro*, pH y Nitrógeno Amoniacal (NH_3)

En la Tabla 5 la digestibilidad *in vitro* de la MS y MO no mostró diferencias ($P=0.1372$ y $P=0.1169$ respectivamente) entre tratamientos, observándose una respuesta lineal en la MS ($P=0.0491$) y MO ($P=0.0491$) a medida que incrementa la dosis de *Bacillus spp.* en el ensilaje de rastrojo de maíz. El pH ruminal no presento diferencias en las horas 2 y 8 entre tratamientos post incubación, en las horas 4 y 12 el pH ruminal disminuyo en los tratamientos T1, T2, T3 en comparación a T4 (7.11 y 7.36) respectivamente post incubación, observándose una respuesta lineal ($P<.0001$), cuadrática ($P=0.0489$) y cúbica ($P=0.0451$) en la hora 4 y una respuesta lineal ($P=0.0008$) en la hora 12. En la hora 24 el pH ruminal disminuyo en los tratamientos T2, T3 y T4 a diferencia de T1 (7.65) post incubación, con una respuesta cuadrática ($P=0.0113$) y cubica ($P=0.0236$). El Nitrógeno

Amoniaco (NH_3) presenta diferencias estadísticas entre tratamientos en las horas 2, 4 y 8 de muestreo post incubación, obteniendo el mayor ($P < 0.05$) los experimentos incubados con T4, con respecto a las horas 12 y 24 el NH_3 no presenta diferencias entre tratamientos.

Tabla 3. Parámetros de producción de gas *in vitro* (ml/0.5g MS degradada) del rastrojo de maíz ensilado a 30 días con *Bacillus spp.*

	TRATAMIENTOS				EEM	P	CONTRASTES		
	T1	T2	T3	T4			L	C	Cu
Parámetros de producción de gas									
PG	467.5a	467.7a	431.2ab	414.9b	10.48	0.0032	0.0005	0.4452	0.2391
B1	53.7a	58.2a	53.7a	45.5a	4.19	0.2173	0.1331	0.1441	0.7767
C1	1.03a	1.01a	1.02a	1.04a	0.018	0.7634	0.6987	0.3581	0.7298
Horas de producción de gas									
3	32.2a	31.4a	30.0a	32.9a	0.99	0.2448	0.8747	0.0857	0.2846
6	51.3a	50.8a	48.1a	51.9a	1.71	0.4449	0.9097	0.2380	0.2687
9	67.7a	66.6a	63.2a	67.8a	2.23	0.4367	0.7644	0.2126	0.3088
12	79.4a	78.8a	74.2a	80.6a	2.72	0.3917	0.9379	0.2126	0.2365
18	105.5a	102.4a	97.4a	106.3a	4.10	0.4309	0.8949	0.1588	0.4064
24	132.5a	128.6a	123.9a	137.1a	5.03	0.3209	0.6919	0.1052	0.4181
36	184.6a	179.4a	171.6a	185.4a	5.52	0.2910	0.8301	0.0991	0.3372
48	228.0a	221.3a	210.6a	220.9a	5.22	0.1653	0.1859	0.1197	0.3016
60	257.2a	249.2ab	237.0b	245.5ab	4.75	0.0487	0.0368	0.0989	0.2542
72	274.8a	266.6ab	253.0b	260.8ab	4.54	0.0204	0.0127	0.0946	0.2064
96	290.9a	282.5ab	268.5b	275.8ab	4.45	0.0129	0.0072	0.0934	0.1900

^{ab} Medias con la misma letra en una fila no difieren $P=0.05$. T1: rastrojo de maíz ensilado con 0 ml/kgMS, T2: rastrojo de maíz ensilado con 1.5 ml/kgMS, T3: rastrojo de maíz ensilado con 3.5 ml/kgMS y T4 rastrojo de maíz ensilado con 4.5 ml/kgMS de *Bacillus spp.*, EEM: error estándar de la media. PG, B y C: son parámetros de la ecuación $\text{mL gas} = \text{PG} (1 + (B/t)^C)^{-1}$ (Groot et al., 1996)

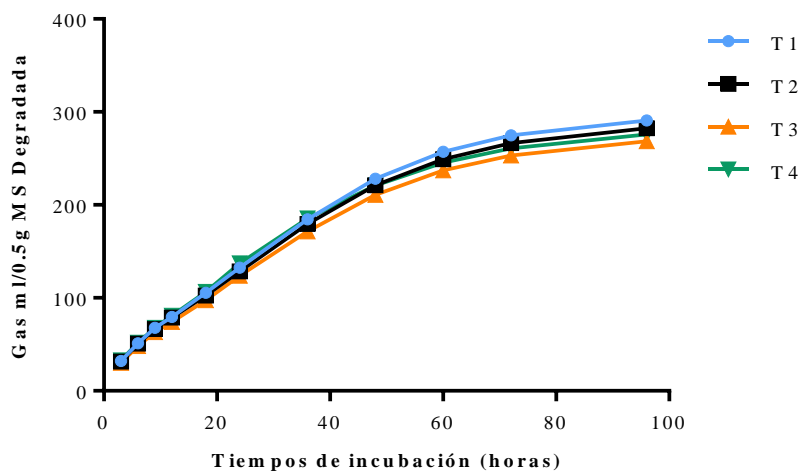


Figura 2. Cinética de producción de gas *in vitro* (ml/0.5g MS degradada) del rastrojo de maíz ensilado *Bacillus spp.* hasta 30 días.

Tabla 4. Parámetros de producción de gas *in vitro* (ml/0.5g MS fermentada) del rastrojo de maíz ensilado a 30 días con *Bacillus spp.*

	TRATAMIENTOS				EEM	P	CONTRASTES		
	T1	T2	T3	T4			L	C	Cu
Parámetros de producción de gas									
PG	550.0a	519.6ab	496.2bc	471.0c	11.91	0.0011	<.0001	0.8273	0.8724
B1	53.7a	58.2a	53.7a	45.5a	4.19	0.2173	0.1331	0.1441	0.7767
C1	1.03a	1.01a	1.02a	1.04a	0.018	0.7634	0.6987	0.3581	0.7298
Horas de producción de gas									
3	37.9a	34.9a	34.6a	37.3a	1.13	0.1260	0.7029	0.0209	0.9163
6	60.3a	56.5a	55.4a	58.9a	1.96	0.2984	0.5452	0.0758	0.8314
9	79.7a	74.0a	72.7a	77.0a	2.54	0.2453	0.4253	0.0647	0.9108
12	93.4a	87.6a	85.4a	91.5a	3.09	0.2755	0.5753	0.0675	0.7524
18	124.1a	113.7a	112.1a	120.7a	4.67	0.2501	0.5754	0.0561	0.9477
24	155.9a	142.8a	142.5a	155.6a	5.70	0.1914	0.9650	0.0335	0.9809
36	217.2a	199.3a	197.4a	210.5a	6.25	0.1140	0.4406	0.0224	0.9718
48	268.3a	245.9ab	242.4b	250.7ab	5.91	0.0270	0.0469	0.0171	0.7922
60	302.6a	276.9b	272.7b	278.6b	5.36	0.0034	0.0048	0.0080	0.6418
72	323.3a	296.2b	291.2b	296.0b	5.14	0.0010	0.0012	0.0056	0.6007
96	342.3a	313.9b	308.9b	313.0b	5.03	0.0005	0.0005	0.0043	0.5344

^{ab}Medias con la misma letra en una fila no difieren $P=0.05$. T1: rastrojo de maíz ensilado con 0 ml/kgMS, T2: rastrojo de maíz ensilado con 1.5 ml/kgMS, T3: rastrojo de maíz ensilado con 3.5 ml/kgMS y T4 rastrojo de maíz ensilado con 4.5 ml/kgMS de *Bacillus spp.*, EEM: error estándar de la media. PG, B y C: son parámetros de la ecuación $\text{mL gas} = \text{PG} (1 + (B/t)^C)^{-1}$ (Groot et al., 1996)

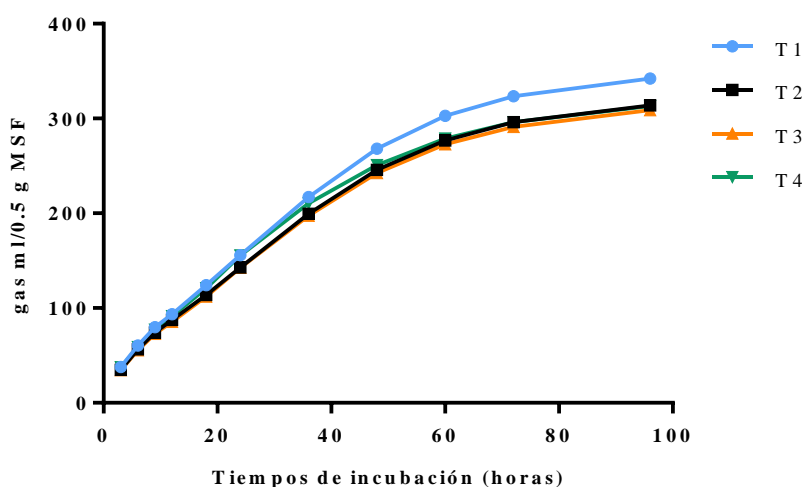


Figura 3. Cinética de producción de gas *in vitro* (ml/0.5g MS fermentada) del rastrojo de maíz ensilado *Bacillus spp.* hasta 30 días.

Tabla 5. Digestibilidad de nutrientes *in vitro*, pH y Nitrógeno Amoniacal (NH₃)

	TRATAMIENTOS				EEM	P	CONTRASTES		
	T1	T2	T3	T4			L	C	CU
Digestibilidad									
MS	68.7 a	72.6 a	73.6 a	74.3 a	1.73	0.1372	0.0491	0.1944	0.9763
MO	67.0 a	71.1 a	71.9 a	72.7 a	1.69	0.1169	0.0291	0.3465	0.6493
pH									
2h	7.06 a	7.03 a	7.04 a	7.09 a	0.020	0.1699	0.2277	0.0592	0.9321
4h	7.01 b	7.04 b	7.03 b	7.11 a	0.011	<.0001	<.0001	0.0489	0.0451
8h	7.02 a	7.06 a	7.02 a	7.09 a	0.020	0.0820	0.0773	0.6379	0.0561
12h	7.06 b	7.12 b	7.17 ab	7.36 a	0.051	0.0048	0.0008	0.2123	0.5247
24h	7.65 a	7.038 b	7.35 ab	7.37 ab	0.111	0.0107	0.3006	0.0113	0.0236
NH₃ mg/l									
2h	19.51c	20.22c	24.8b	27.71a	1.345	0.0002	0.0001	0.1342	0.2341
4h	20.00c	21.73c	25.5b	29.52a	1.123	0.0001	0.0001	0.2134	0.1634
8h	11.33c	11.51c	14.25b	18.12a	1.421	0.0001	0.0001	0.5234	0.1342
12h	9.61a	9.14a	10.51a	10.73a	1.643	0.0598	0.0423	0.0653	0.0853
24h	7.53a	7.71a	8.33a	8.60a	1.939	0.0621	0.0451	0.0934	0.0745

^{a,b,c} Medias con la misma letra en una fila no difieren MS: materia seca, MO: materia orgánica, pH, Nitrógeno Amoniacal (NH₃), T1: rastrojo de maíz ensilado con 0 ml/kgMS, T2: rastrojo de maíz ensilado con 1.5 ml/kgMS, T3: rastrojo de maíz ensilado con 3.5 ml/kgMS y T4 rastrojo de maíz ensilado con 4.5 ml/kgMS de *Bacillus* spp.

5.1.5. Ácidos grasos volátiles

En la Tabla 6 la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) como el Acético (A), Butírico, Isobutírico, Isovalérico, Valérico, y el ratio A/P no mostraron diferencias entre tratamientos en los tiempos post incubación. Por otra parte el ácido Propiónico (P) fue diferente en los tratamientos T3 y T4 en las horas (2, 4) y (2, 4 y 8) respectivamente, observándose una respuesta lineal en las horas 2, 4 y 12.

5.2. DISCUSIÓN

Con respecto a la degradación ruminal de MS (g/Kg) del rastrojo de maíz ensilado con *Bacillus spp.* a diferentes dosis se observó que gracias a la acción de los *Bacillus spp.* encargados de producir enzimas celulolíticas con actividad endo- β -1,4-glucanasa y exo- β -1,4-glucanasa mencionado por Hernández *et al* (1999), la degradación ruminal de la MS en la fracción soluble (a) no mostró diferencias (P=0.4567) entre tratamientos, cuyos valores fueron (39.65 - 40.57%) que corresponde a la fracción que desaparece rápidamente de la bolsa y representa la fracción que es rápida y completamente degradada en rumen es mayor en comparación a los reportados por Rendón *et al* (2013) en trabajos realizados para evaluar el efecto de la inclusión de diferentes niveles de vinaza en ensilaje de maíz sobre la cinética de degradación ruminal (24,3 - 29,0%) y similares a los valores reportados por Araiza *et al.* en trabajos realizados para evaluar el efecto de la adición de desecho de manzana (ripio) y melaza, sobre la digestibilidad y degradabilidad del ensilado de maíz

forrajero (39.49 - 42.53%), los ensilajes con *Bacillus spp.* pueden estar presentando una mayor cantidad de carbohidratos solubles que hace que aumente la fracción soluble, además influye directamente en el aumento de la degradabilidad efectiva de los ensilajes permitiendo así darle mayor accesibilidad a los microorganismos ruminales para que tengan una mejor degradación tal como se lo observa en esta investigación.

Con respecto a la degradación ruminal de la MO, la fracción soluble (a) fue mayor ($P < .0001$) en T1 (37%), T2 (39%) y T4 (38%) con relación al T3, observándose una respuesta cúbica ($P < 0.0001$) a los tratamientos. La fracción insoluble pero potencialmente degradable (b) fue mayor ($P < .0001$) en T3 (45%) y T4 (44%) con respecto a los demás tratamientos, mostrando una respuesta lineal ($P = 0.0002$) y cúbica ($P < .0001$) a medida que incrementa la dosis de *Bacillus spp.* en el ensilaje de rastrojo de maíz. Hay evidencias que sugieren que las enzimas fibrolíticas actúan como agentes degradantes de la fibra, promueven una mayor colonización del alimento e incrementan el número de microorganismos, tanto fibrolíticos como no fibrolíticos en el líquido ruminal; lo cual incrementa la degradación en la fracción del alimento digerida más lentamente por los microorganismos ruminales (Bowman et al., 2003). Los parámetros generados por el modelo de Ørskov & McDonald (1979) indican efectos de la inclusión de *Bacillus spp.* en la degradación efectiva con las diferentes tasas de pasaje (k) fue mayor ($P > 0.05$) en T2 y T4 con relación a los demás tratamientos, obteniendo una respuesta lineal ($P < 0.05$) y cúbica ($P < 0.05$) al 0.02 y 0.05 ($k/\%h^1$), y con respecto a 0.08 ($k/\%h^1$) mostró una respuesta cúbica ($P < .0001$) a los tratamientos.

En la producción de gas de MS fermentable si bien no hay una diferencia significativa entre la digestibilidad de la MS y MO pero tenemos una diferencia lineal al momento que incrementamos el nivel o dosis de *Bacillus spp.* en el ensilaje de rastrojo de maíz lo cual al tener una mayor digestibilidad o ir incrementando los niveles proporcionales de digestibilidad en los tratamientos estamos teniendo una mayor fermentación y mejor asimilación en los procesos fermentativos del rumen lo cual disminuye la metanogénesis ruminal y disminuye la producción de gas a nivel del rumen. El pH ruminal y el nitrógeno amoniacal presenta valores altos en T3 y T4 post incubación debido a los hidratos de carbono (H_2OC) presentes en el ensilaje de maíz con altas dosis de *Bacillus spp.* El tipo de H_2OC condiciona el desarrollo del tipo de flora adecuada para su fermentación y el ajuste del pH a su rango ideal, (Van Kessel et al., 1996). En cuanto a la producción de ácidos grasos volátiles obtenemos mayor producción de ácido Propiónico en los tratamientos T3 y

T4 a las primeras horas post incubación y reduce en el transcurso del tiempo esto junto a un pH promedio de 7.3 dificulta el desarrollo de una flora amilolítica y por tanto favorece la actividad de las bacterias celulolíticas (Volpi-Lagreca et al., 2015).

Tabla 6. Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) *in vitro*

	TRATAMIENTOS				EEM	P	CONTRASTES		
	T1	T2	T3	T4			L	C	CU
Ácidos grasos volátiles (% molar)									
Acético (A)									
2h	74.20a	74.10a	73.52a	73.12a	2.345	0.0632	0.0478	0.3451	0.1253
4h	74.01a	74.32a	73.50a	72.51a	3.153	0.0612	0.0312	0.2340	0.1943
8h	72.61a	72.21a	72.92a	70.86a	2.431	0.0598	0.0416	0.0632	0.2317
12h	73.23a	72.85a	71.71a	71.34a	2.917	0.0627	0.0054	0.0763	0.1845
24h	74.80a	73.51a	73.32a	73.51a	1.875	0.0925	0.0587	0.3256	0.2941
Propiónico (P)									
2h	16.31b	16.52b	17.20a	17.83a	1.324	0.7231	0.0472	0.2312	0.1743
4h	16.11b	16.71b	17.53a	18.51a	2.451	0.0612	0.0021	0.1712	0.2849
8h	17.83b	17.50b	17.80b	19.42a	1.762	0.0791	0.0572	0.0641	0.0581
12h	16.20b	16.81b	18.01a	19.00a	3.416	0.0622	0.0015	0.2354	0.1831
24h	15.71a	16.01a	16.22a	16.02a	2.821	0.0769	0.0714	0.0851	0.1912
Butírico									
2h	6.52a	6.41a	6.30a	6.21a	0.973	0.0927	0.1643	0.1731	0.2741
4h	6.90a	6.10a	6.21a	6.40a	1.231	0.1731	0.2659	0.2451	0.1842
8h	6.62a	7.22a	6.31a	6.72a	0.865	0.1352	0.0917	0.1739	0.1382
12h	7.71a	7.80a	7.40a	6.81a	0.898	0.1864	0.2679	0.1690	0.1639
24h	7.10a	7.81a	7.72a	8.04a	1.182	0.0971	0.1781	0.2789	0.1634
Isobutírico									
2h	0.95a	0.93a	1.00a	0.94a	0.281	0.8271	0.4529	0.1624	0.2713
4h	1.10a	0.90a	0.91a	0.91a	0.176	0.4871	0.1783	0.2691	0.1634
8h	0.95a	0.93a	1.01a	0.94a	0.189	0.1736	0.2618	0.2790	0.2278
12h	1.04a	0.83a	1.20a	1.02a	0.212	0.1821	0.1832	0.1719	0.2109
24h	0.82a	1.01a	1.05a	0.81a	0.101	0.0891	0.1890	0.0892	0.1830
Isovalérico									
2h	1.21a	1.31a	1.20a	1.10a	0.171	0.3671	0.2901	0.1780	0.3610
4h	1.10a	1.21a	1.21a	1.00a	0.120	0.6190	0.1828	0.5012	0.4812
8h	1.20a	1.30a	1.20a	1.30a	0.172	0.2813	0.3910	0.4112	0.3801
12h	1.31a	1.10a	1.00a	1.11a	0.149	0.3701	0.1728	0.3910	0.1267
24h	1.21a	1.22a	1.30a	1.21a	0.133	0.1788	0.4811	0.2771	0.1529
Valérico									
2h	0.85a	0.87a	0.81a	0.86a	0.112	0.2217	0.1782	0.1661	0.2921
4h	0.80a	0.87a	0.75a	0.75a	0.098	0.5810	0.4781	0.2701	0.2601
8h	0.85a	0.87a	0.80a	0.86a	0.075	0.1391	0.1720	0.1489	0.1494
12h	0.67a	0.75a	0.75a	0.80a	0.109	0.0891	0.0692	0.1291	0.1032
24h	0.40a	0.50a	0.50a	0.50a	0.062	0.2818	0.2371	0.1321	0.1812
Ratio A/P									
2h	4.55a	4.49a	4.27a	4.10a	0.191	0.2671	0.1892	0.2721	0.2431
4h	4.59a	4.45a	4.19a	3.92a	0.218	0.0621	0.0471	0.3181	0.2671
8h	4.07a	4.13a	4.10a	3.65a	0.264	0.0713	0.0490	0.1791	0.1266
12h	4.52a	4.33a	3.98a	3.75a	0.182	0.0610	0.0469	0.2912	0.2994
24h	4.76a	4.59a	4.52a	4.59a	0.137	0.4218	0.2843	0.3819	0.1749

^{a,b} Medias con la misma letra en una fila no difieren. Acético (A), Propiónico (P), Butírico, Isobutírico, Isovalérico, Valérico, Ratio A/P.

CAPÍTULO VI

6.1. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio se concluye que la adición de los Bacillus en los ensilajes fibrosos solubiliza la fibra insoluble, lo cual permite que los microorganismos ruminales tengan más acción a esos nutrientes para poder degradarla lo cual genera mayor degradación de los nutrientes, mejor digestibilidad, incrementa el ácido Propiónico en el rumen y disminuye los gases de efecto invernadero.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

- Aldrich, S.R., Leng, E.R. (1974). Producción moderna de maíz. Editorial Hemisferio Sur. Argentina. 308 p.
- Araiza, R. E., Delgado, L. E., Carrete, F. O., Medrano, R. H., Solis, S. A., Murillo, O. M., Haubi, S. C. (2013) Degradabilidad ruminal *in situ* y digestibilidad *in vitro* de diferentes formulaciones de ensilados de maíz-manzana adicionados con melaza. 79-96
- Anon, C. (1998). The World`s microbial experts. Probios. Disponible en: www.chrhansen.com. En línea, Consultado: Diciembre 2016.
- Benitez, A., (1980), Pastos y Forrajes, Quito-Ecuador, Editorial Universitaria, Pág. 137 a 140- 171 y 172.
- Bhat, M.; Hazlewood, G. (2001). Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. Page 11 in Enzymes in Farm Animal Nutrition. M. Bedford and G. Partridge, ed. CABI Publishing, Oxon, U.K.
- Berkeley, R. (1986). Genus Bacillus. In: Sneath, P.H.A. et al. editores. Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins. Pag.1105-1139
- Berto, J.; Frenzel, R. (1997). Silagen de aveia preta no estadio vegetativo, submetida a ação de inoculantes e ao efecto do emurchecimento. Rev. Bras. Zootc. 26:651.
- Blaxter K.L. & Clapperton.1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. British Journal of nutrition. V 19 p 511-522.
- Bortolozo, F.; Kira, K. (2002). Probióticos. Uso de los probióticos en la alimentación de pollos de ceba. File://A:/ probióticos 10. Htm.pp:1
- Bowman, G. R., Beauchemin, K. A., Shelford, J. A. (2003). Fibrolitic enzymes and parity effects on feeding behavior, salivation, and ruminal pH of lactating dairy cows. 565-575.
- Bustamante, J. Estrategias de alimentación para la ganadería bovina en Nayarit. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México. Pag. 22.

- Cañete MV, Sacha J L Ensilado de forrajes y su empleo en la alimentación de rumiantes. 1998; p. 1- 260.
- Caraballo, A. 2012. Efecto de la melaza, estado fisiológico del pasto y tamaño del material cosechado sobre el ensilado de pasto guinea (*Panicum máximum* Jacq.) y Maíz (*Zea mays*). Consultado en línea el 22 de junio del 2014. Disponible en: www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid.es.
- Casula, G.; Cutting, S.; (2002). *Bacillus* Probiotics: Spore Germination in the Gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.68 No.5, 2344-2352.
- Cattani, P. (2011). Henificación, conservación de forrajes. Pag. 1
- Cavali, J., Pereira O., Sousa L. et al. (2006). Silagem de cana-de-açúcar tratada com óxido de cálcio: composição bromatológica e perdas. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 43. João Pessoa. João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia.
- Celanie, E. (1982) Etude de l'evolution microbiologique et des caracteristiques fermentaires des ensilages de canne a sucre, de sorgho et de pangola en climat tropical humide. Tesis presentada para la obtención del Diploma de Doctor de 3er. ciclo. Université Pierre et Marie Curie. Paris
- Cussen, R.; Merry, R.; Williams, A.; Tweed, J. The effect of additives on the ensilage of differing perennial ryegrass and white clover content. *Grass and Forage Science*. 50(249-258).
- De la Roza B. El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. IV Jornadas de Alimentación Animal. Laboratorio de Mourisca de Lalín (Pontevedra). 2005; p. 1-20.
- Dean, D.; Adesogan, T.; Krueger, N.; Littell, R. (2005). Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of bermudagrass silage. *J.Dairy Sci.*, 88: 994-1003.

- Díaz, R.F., Brizuela, M.A., Serrano, P., Martínez, A., & González, L.A. (2001). Inoculantes y otros aditivos en ensilajes. Efecto en el valor nutritivo de la paja de arroz
- Elizondo, J. (2015). Calidad nutricional y consumo de forraje de maíz (*zea mays*) y forraje de estrella africana (*cynodon nlemfuensis*) con o sin alimento balanceado en cabras.
- Ensminger, M.; Olentine, C.; (1978). Feeds y Nutrition. Abridget. First edition. USA. Traducido por el Dr. Mario Marino. Alimentos y Nutrición de los Animales. Editorial El Ateneo. 1983. Argentina. Pgs. 143 -188.
- Espinoza, F., Argenti, P., Urdaneta, G., Araque, C., Fuentes, Palma, J., Bello, C. (2004) Uso del forraje de maíz (*Zea mays*) hidropónico en la alimentación de toretes mestizos. *Zootecnia Tropical*. 22: 303-315.
- Frevel, H.J.; Engel, G.; Teuber, M. (1985). Schimmelpilze in Silage und Rohmilch. *Milchwissenschaft*. Vol. 40 (1985); Pág. 129-132
- Fuentes, J., Magaña, C., Suarez, L., Peña, R., Rodríguez, S., Ortiz, B. (2001). Análisis químico y digestibilidad *in vitro* de rastrojo de maíz (*Zea Mays* L.). *Agronomía Mesoamericana*. 12:189-192.
- Garcés, M.A., Roa, L.B., Ruiz S., Serna de León, J.G., & Builes, A.F. (2004). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. 66-67
- Garcés A E, Suárez G, Ruiz S. Evaluación de la calidad bromatológica del ensilaje de pasto kikuyo y maní forrajero. *Rev Lasallista de Investigación*. Corporación Universitaria Lasallista 2006; 3 (2): 34-37.
- Hammes, W.P. et al. (1992) The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, in: Balows et al. Pag. 1535-1594
- Hernández, V. L., Garza, Y., Gutiérrez, B., Gaona, J. G. (1999). Caracterización de enzimas celulolíticas sintetizadas por bacterias de ambientes extremos. Vol.43 137-142.

- Hillal, H.; El-Sayaad, G.; Abdella. M. (2011). Effect of growth promoters (probiotics) supplementation on performance, rumen activity and some blood constituents in growing lambs. *Archiv Tierzucht* 54:607-617.
- Holzapfel, W.H.; Schillinger, U. (1992). The Genus *Leuconostoc*. in: Balows et al. Pag. 1508-1534
- Honig, H.; Woolford, M K. (1980). Changes in silage on exposure to air. Thomas, C.; Editor. Forage Conservation in the 80s. (11:1980: Hurley). BGS Occasional Symposium. Hurley: British Grassland Society, 1980. Pag. 76-87
- Hristov, A.; McAllister, T. (2002). Effect of inoculants on whole-crop barley silage fermentation and dry matter disappearance *in situ*. *J. Anim. Sci.*, 80: 510-516.
- Jawets. (1996). Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno.15. Edición.pp:834-835.
- Kung, Jr.; Muck, R. (1997). Animal responseto silage additives. In Silage: Field to Feedbunk [NRAES-99] (pp. 200-210). Ithaca, NY: Northeast Regional Agricultural Engineering Service.
- Lindgren, S. et al. (1985). Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.Vol.36. Pag. 765-774.
- Loayza, L. (2007). Uso de subproductos industriales en el feedlot en “Argentina y Ecuador”. Pag. 19 – 65.
- López, M.; Ortega, J. (2006), Mejora del proceso de ensilaje del maíz por adición de lactosuero.
- Merry, R. J. et al. (1997). Current and future approaches to biocontrol in silage. En: Proceedings of the 8th International Symposium on Forage Conservation. Czech Republic: Research Institute of Animal Nutrition. Pag. 17-27
- McConnell M.; Tannock, (1997). Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological response of their human hosts to predominant strains. *Ross Tech. Boletín Técnico* 99/37.

- McDonald, P. et al. *The Biochemistry of Silage*. 2nd ed. Marlow: Chalcombe Publications, 1991.
- Muck, R.; Bolsen, K. (1991). Silage preservation and silage additive products. In: *Field guide for hay and silage management in North America*. K.K. Bolsen, J.E. Baylor y M.E. McCullough. Ed. Natl. Feed Ingrid. Assoc. West Des Moines IA. p. 105
- Nadeau, E.; Russell, J.; Buxton, D. (2000). Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulose, inoculant, and formic acid fed to lambs. *J. Anim. Sci.*, 78: 2980-2989.
- Ojeda F, Cáceres O, Matamoros E. Conservación de pastos y forrajes en zonas tropicales. In: *Recursos forrajeros herbáceos y arbóreos*. Cuba: Estación Experimental de Pastos y Forrajes. Indio Hatuey. 1990; 54 p.
- Ooi, T., Kikuchi, D. (1995). Purification and some properties of β -mannanase from *Bacillus* sp. 310-312
- Ørskov, E.R., and I. McDonald. 1979. The estimate of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92:499-503.
- Orskov ER, Howell FD, Mould F. 1980. The use of nylon bag technique for the evaluation of feedstuff. *Trop Anim Prod*. 15(3):195-213.
- Paladines, O, (1992), Metodología de pastizales para trabajar en fincas y Proyectos de Desarrollo Agropecuario, manual No. 1, PROFOGAN, Ecuador.
- Phillip, L.E.; Fellner, V.((1992)) Effects of bacterial inoculation of high moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers. En: *Journal of Animal Science*. Vol. 70, no. 10; 3178-3187.
- Preston, T. R., Murgueitio, E. (1992). Strategy for sustainable livestock production in the tropics. *Strategy for sustainable livestock production in the tropics*.
- Qiao, G.; Shan, A.; Ma, N.; Ma, Q.; Sun, Z. (2008). Effect of supplemental *Bacillus* cultures on rumen fermentation on milk yield in Chinese Holstein Cows. En línea. Consultado: diciembre 2016. Disponible en: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. Pág. 432-433.

- Ramírez, M., Lissette, L., Esperance, M. (1991), utilización de aditivos en la conservación de forrajes en forma de ensilaje. I. Aditivos biológicos.
- Rendón, M.E., Noguera, R., Posada, S.L. (2013). Cinética de degradación ruminal del ensilaje de maíz con diferentes niveles de inclusión de vinaza. 48-50
- Ruiz S., Serna de León, J.G., & Builes, A.F. (2004). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado.66-67
- Ruiz, B.O.; Castillo, Y.; Anchondo, A.; Rodríguez, C.; Beltrán, R.; La O, O.; Payán, J.(2009) Efectos de enzimas e inoculantes sobre la composición del ensilaje de maíz Archivos de Zootecnia, vol. 58, núm. 222, 2009, pp. 163-172 Universidad de Córdoba Córdoba, España.
- Santos M.; Gomez, M.; Perez, J.; Perea, G.; Fernandez, A.; Ferreira, C. (2009). Composição química de silagens obtidas em microsilos encobertos por plástico confeccionados com diferentes produtos- Resultados preliminares. XVIII Congresso de Zootecnia, UTAD- Vila Real Portugal. Pág 462-465.
- Suarez, D.; Zarate, J (2013). Efecto de la utilización de cal viva como aditivo sobre los parámetros de fermentación y la calidad nutricional en el ensilaje de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), papa (*Solanum tuberosum*) y arveja (*Pisum sativum*)
- Torres, M. (2015). Alternativas para alimentación de bovinos con base en caña de azúcar. Pag. 3.
- Van Kessel, J. A. S., & Russell, J. B. (1996). The effect of pH on ruminal methanogenesis. FEMS Microbiology Ecology, 20(4), 205-210.
- Viera Da Cunha.. Conservação de forragem. Pesquisador da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) e Doutorando do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da UFRPE. 2009; p. 1-26.
- Volpi-Lagreca, G., Alende, M., Pordomingo, A., Babinec, F., & Ceron, M. (2015). Engorde de bovinos a corral: Efectos de monensina y de dos niveles de taninos condensados de quebracho sobre el comportamiento productivo, la fermentación ruminal y la degradabilidad in situ de la materia seca y de la proteína. Revista Argentina de Producción Animal, 33(2), 65-77.

6.3. Anexos

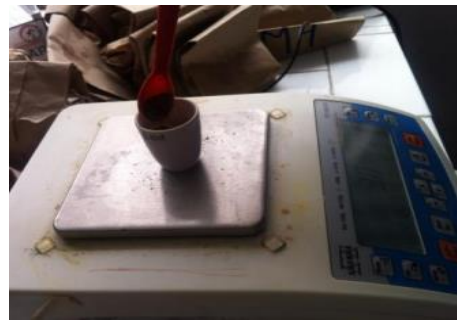
Anexo 1. Preparación del ensilaje.



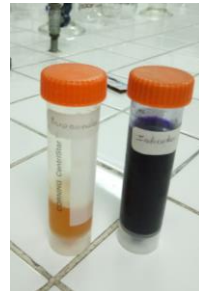
Anexo 2. Determinación de pH, MS, molido y tamizado del ensilaje después de 30 días de ensilado.



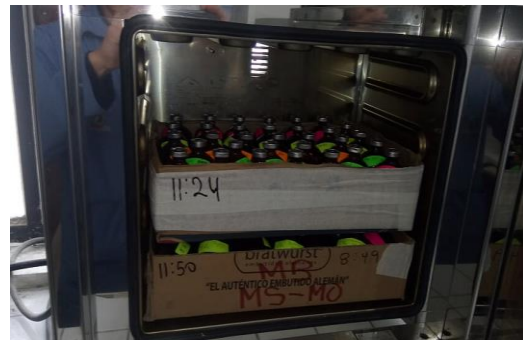
Anexo 3. Degradación ruminal *in situ*.



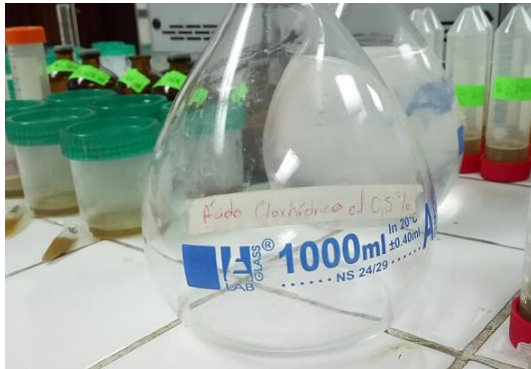
Anexos. 4. Digestibilidad aparente de la M.S *in vitro*



Anexo 5. Producción de gas *in vitro*.



Anexo 6. Nitrógeno Amoniacal (N-NH₃) y Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)



CAPITULO VII

PROPUESTA

7.1. DATOS INFORMATIVOS

Tema: Recomendar la adición de *Bacillus spp.* a dosis de 4.5 ml en ensilaje de maíz (*zea mays*) para mejorar la digestibilidad y parámetros productivos en bovinos.

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

En el Ecuador, el maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos principales más importantes y uno de los elementos básicos de la dieta de la población. Así, la superficie cosechada con maíz según el Servicio de Información y Censo Agropecuario alcanza las 229 636 ha con una producción de 254 840 000 kilogramos para el año 2005. Según el último diagnóstico Provincial Agropecuario realizado en Santo Domingo existen 450 hectáreas de maíz para producción de forraje sembradas durante el año 2011 (SINAGAP, 2011)

El ensilaje es un importante método para preservar los forrajes destinados a la alimentación bovina. Mediante este proceso, el material ensilado se conserva con un mínimo de pérdidas de materia seca y nutriente, manteniendo una buena palatabilidad para el ganado (De la Roza, 2005; Viera, 2009). Con la fermentación natural que se da dentro del ensilaje se busca inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables que afectan la degradación de la materia seca y el valor nutricional del material ensilado (Garcés *et al.*, 2006; Cañete *et al.*, 1998).

La estabilidad del proceso fermentativo puede manejarse por medio del uso de aditivos acidificantes como los ácidos orgánicos, compuestos nitrogenados, melazas que pueden ser adicionados al forraje al momento de ser ensilado (Ojeda *et al.*, 1990), también se menciona el uso de estimulantes e inhibidores de la fermentación, inhibidores de la deterioración aeróbica, de los nutrientes y absorbentes, estos aditivos pueden ser biológicos o químicos (Weinberg y Ashbell, 2003), así como biocatalizadores que ayudan a solubilizar la pared celular como hongos, bacterias y levaduras (Bhat; Hazlewood, 2001).

En este sentido sabemos que bacterias del género *Bacillus spp.* empleados como aditivos en ensilajes de rastrojo de maíz ayudan a mejorar la calidad nutricional gracias a que estos microorganismos generan enzimas con capacidad de hidrolizar la celulosa y hemicelulosa permitiendo así el mejor aprovechamiento de nutrientes para los rumiantes y la reducción de gases efecto invernadero.

En este estudio científico se determinara, el efecto de la adición de *Bacillus spp* a dosis de 4.5 ml en ensilaje de maíz (*zea mays*) para mejorar la digestibilidad y parámetros productivos en bovinos.

7.3. JUSTIFICACIÓN

En el país la producción ganadera se basa en la alimentación por pastoreos rotativos, producción de pastizales a expensas de lluvias y sequías, por lo cual en épocas de sequía el valor nutricional y rendimiento de la biomasa forrajera es limitada reduciendo así el desempeño productivo de los animales y por consiguiente un bajo ingreso económico.

Al utilizar el inóculo de *Bacillus spp.* a dosis de 4,5 ml/Kg MS en ensilaje de rastrojo de maíz ensilado a 30 días, se pretende determinar la dosis óptima y el mejor periodo de ensilaje para aprovechar los valores nutritivos que poseen para la alimentación del ganado además disminuir la emisión de Gases Efecto Invernadero (GEI) que estos producen.

Al desarrollar este proyecto de investigación aprovechando el rastrojo de maíz para crear ensilajes con adición del inóculo de *Bacillus spp.* a dosis de 4,5 ml/Kg MS a 30 días, cuya implementación en la producción pecuaria permitirá garantizar un impacto positivo en la economía del productor reduciendo costos de alimentación y mejorar el valor nutritivo del ganado en épocas de sequía y carencia de pastos, además de reducir la contaminación ambiental.

El propósito de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato es responder a los problemas científicos, tecnológicos y sociales de la población, participando activamente con sus comunidades.

7.4. OBJETIVOS

7.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de *Bacillus spp* a dosis de 4.5 ml en ensilaje de maíz (*zea mays*) sobre la digestibilidad y parámetros productivos en bovinos.

7.4.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la adición del inóculo de *Bacillus spp.* en el ensilaje de maíz a dosis de 4.5 ml ensilado a 30, 50 y 70 días sobre la digestibilidad ruminal de los nutrientes.

- Evaluar el efecto de la adición de *Bacillus spp.* en el ensilaje de maíz a dosis de 4.5 ml y ensilado a 30, 50 y 70 días sobre la conversión alimenticia, ganancia de peso, producción de leche.

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Este proyecto es totalmente factible en lo económico, ambiental y social, al permitir aprovechar el rastrojo de maíz producto de la cosecha para mejorar el manejo alimentario en épocas de escases además de disminuir los gases efecto invernadero que producen los bovinos, reducir los costos de producción y mejorar el rendimiento productivo de los ganaderos.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

La demanda de alimentos de origen animal de leche y carne se han incrementado desde hace varios años a nivel mundial, por lo cual es necesario desarrollar tecnologías que ayuden a los productores ganaderos a mejorar eficientemente sus explotaciones ganaderas y poder consolidarse en el mercado nacional e internacional garantizando la seguridad alimentaria del consumidor.

Aprovechar los subproductos de cosecha para la elaboración de ensilajes, henolajes y dietas que mejoren la calidad del alimento ofrecido al animal y abastezcan en épocas de sequía o carencia de pastos es una de las técnicas que promueven el cuidado del medio ambiente, el mejoramiento de las características nutricionales del forraje y la implementación de sistemas estratégicos de suplementación, como la presencia de otros estratos vegetales en el ecosistema pasturas, tipo de sistemas silvopastoriles, o el aprovechamiento de subproductos agrícolas mejorando las características fermentativas a nivel ruminal, reflejándose en mayor productividad y generalmente en una disminución en las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI).

7.7. METODOLOGÍA

- Inclusión de ensilaje de rastrojo de maíz con *Bacillus spp.* a la dieta diaria.
- Evaluación de consumo diario de Materia seca.
- Evaluación de consumo diario de Materia orgánica.
- Determinación de la digestibilidad, fermentación y producción de gas.

7.8. ADMINISTRACIÓN

La administración de esta investigación estará a cargo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Se recomienda realizar la evaluación del proyecto para que los resultados sean confiables, y los mismos publicados en beneficio de los productores de nuestro país.