

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**APLICACIÓN DE EXTRACTO DE LÚPULO Y BETA-ÁCIDOS PARA MEJORAR
LA ESTABILIDAD AERÓBICA Y LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO*
DEL ENSILAJE DE PASTO MARALFALFA (*CENCHRUS PURPUREUM*)**

POR:

LIC. LIANNE ROMERO VILORIO

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

DICIEMBRE 2025



Aplicación de extracto de lúpulo y β -ácidos para mejorar la estabilidad aeróbica y la fermentación ruminal *in vitro* del ensilaje de pasto maralfalfa (*Cenchrus purpureum*). Tesis presentada por Lianne Romero Vilorio como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:


D.Ph. Alfredo Pinedo Álvarez
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología


Dra. Rosalía Sánchez Basualdo
Secretaria de Investigación y Posgrado


Dr. Lauro Manuel Espino Enríquez
Coordinador Académico


Ph.D. Oscar Ruiz Barrera
Presidente

20-Enero-2025
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Fecha: NOVIEMBRE 3, 2024

Después de haber reunido la revisión final del trabajo de tesina a nivel Maestría, bajo el nombre: APLICACION DE EXTRACTO DE LUPULO Y BETA-ACIDOS PARA MEJORAR LA ESTABILIDAD AEROBICA Y FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO DEL ENSILAJE DE MORALES

Elaborado por: LIANNE ROMERO VIKORIO

Los integrantes del comité están de acuerdo en que dicho trabajo satisface los requisitos para su publicación (indicándolo con una "X"), desde el punto de vista de:

Puesto en comité	Nombre y firma	Contenido Técnico	Análisis de la Información	Formato (estilo y forma)
Asesor:	<u>OSCAR RUIZ BARRERA</u> 	✓	✓	✓
Representante área relacionada:	<u>Yumicely Castillo C.</u> 	✓	✓	✓
Representante área estadística:	<u>del Dominguez Vivero</u> 	✓	✓	✓
Representante de la coordinación:	<u>Pera Lucía Ordóñez Baquerá</u> 	✓	✓	✓

Dr. Lauro Manuel Espino Enríquez
Unidad/Coordinación Académica
Vo. Bo.

Fecha actualización: octubre 2024

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA
Periférico Francisco R. Almada km 1
C.P. 31453 Chihuahua, Chih.
Tel. 52 (614) 434-0363, 434-0304, 434-0458 fax 434-0345
www.fz.uach.mx

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar gracias a todas las personas a mi alrededor que me ayudaron y me apoyaron para lograr esta meta.

Agradecer a CONAHCYT por el apoyo financiero para culminar mis estudios de maestría.

Mi familia jugó un papel fundamental, fueron dos años de muchos cambios, alegrías y tristezas, pero se logró el objetivo.

A Oscar, Yami, Bexy y Cristian me ayudaron incondicionalmente y si llegué hasta aquí es sin duda gracias a ustedes, estaré en deuda toda la vida.

A mi esposo por su apoyo todo el tiempo ya tenemos otra meta cumplida, ahora viene la siguiente.

Alfredo y Marjories el apoyo en los momentos claves, las palabras que me mantenían firme en mis objetivos, que hoy felizmente cumpla, este éxito es también suyo.

A Carla y Jesús que me brindaron un nuevo hogar en México, me acompañaron en los momentos más difíciles.

Iliana y Litzis mis animadoras fervientes, creyendo en mí más de lo que yo creía.

A Yoa y Teresa sus palabras antes de comenzar esta aventura las traje conmigo y no las pienso decepcionar.

A Any que me brindó su amistad, su tiempo y confianza, también gracias al resto de mis compañeros de clases.

A Sophia y Cheche, que su ayuda en el laboratorio y su plática fue de gran ayuda.

Gracias por las porras, las palabras de aliento y el apoyo. ¡¡¡Mil gracias a todos!!!!

DEDICATORIAS

A mi abuela, mi esposo y mi familia...Este logro no es solo mío sino también de ustedes.

CURRICULUM VITAE

La autora nació el 10 de abril de 1994 en Boyeros, La Habana, Cuba.

2012-2017	Estudios de Licenciatura en Microbiología en la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana (UH)
2017	Obtención del título de Licenciada en Microbiología
2017 – 2019	Especialista en Validación Producción de FCE-hr en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
2019 – 2022	Especialista de Investigación-Desarrollo en Microbiología en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB)
2023 – Actualidad	Estudiante de Maestría en Ciencias en Producción Animal en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua

RESUMEN

APLICACIÓN DE LÚPULO Y EXTRACTO DE B-ÁCIDOS PARA MEJORAR LA ESTABILIDAD AERÓBICA Y LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DEL ENSILAJE DE PASTO MARALFALFA (*CENCHRUS PURPUREUM*)

LIC. LIANNE ROMERO VILORIO

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Ph.D. Oscar Ruiz Barrera

En este estudio se evaluó el potencial del lúpulo (*Humulus lupulus L.*) y extractos de β -ácidos en el mejoramiento de la calidad de ensilaje de pasto maralfalfa (*Cenchrus purpureus*) en la exposición aeróbica y su efecto residual en la fermentación ruminal *in vitro*. Se incubó el ensilaje previamente expuesto al aire con gránulos de lúpulo molido (var. Galena y Chinook) y un extracto de β -ácidos. Las muestras de ensilaje fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Se determinó el pH, conteos de hongos y levaduras, coliformes totales y ácidos grasos volátiles (AGV). Posteriormente se realizó la fermentación ruminal *in vitro* de los tratamientos anteriormente evaluados para determinar la producción total de gas y las concentraciones de hidrogeno (H₂), metano (CH₄) y dióxido de carbono

(CO₂) y las concentraciones de AGV. El tratamiento con β -ácidos mantuvo controladas las poblaciones de levaduras. Se observó un aumento significativo del pH para los tratamientos de Galena y Chinook con respecto al control ($p < 0.05$), sin embargo, entre el control y el tratamiento con β -ácidos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Las concentraciones de butirato en el ensilaje fueron menores comparadas al control, excepto en el tratamiento con lúpulo Galena. En la fermentación ruminal *in vitro*, el tratamiento con β -ácidos mostró cantidades de butirato y propionato mayores, pero no significativas a los tratamientos con Chinook y Galena. Para las concentraciones de metano no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Se concluye que los β -ácidos podrían contribuir a reducir el deterioro del ensilaje en la fase aeróbica y su efecto residual podría mejorar la fermentación ruminal *in vitro*.

ABSTRACT

APPLICATION OF HOPS AND B-ACIDS EXTRACT TO IMPROVE AEROBIC STABILITY AND *IN VITRO* RUMINAL FERMENTATION OF MARALFALFA GRASS SILAGE

BY:

LIANNE ROMERO VILORIO

The potential of hops (*Humulus lupulus* L) and β -acids extract were evaluated for improving the quality of maralfalfa grass (*Cenchrus purpureus*) silage during aerobic exposure and their residual effects on *in vitro* ruminal fermentation characteristics. Silage samples of ground hops pellets (varieties Galena and Chinook) as well as β -acids mixtures were incubated at 37 °C for 24 h then maintained under aerobic exposure for 12 hours. Sample pH, counts of filamentous fungi, yeasts, and total coliforms, and volatile fatty acid (VFA) concentrations were determined. Subsequently, *in vitro* ruminal fermentation was conducted to determine total gas production and concentrations of hydrogen, methane, carbon dioxide, and VFAs. The β -acids treatment controlled yeast populations, but an increase ($p < 0.05$) in pH values was observed for the Galena and Chinook treatments compared to the Control. However, no differences ($p > 0.05$) were found between the Control and the β -acids treatment. Butyric acid concentrations in the silage were lower ($p < 0.05$) compared to the Control, except in the silage treatment with Galena hops. In the *in vitro* ruminal fermentation, the β -acids treatment showed higher butyric acid levels than the Chinook and Galena treatments, but these differences were not significant ($p > 0.05$). There were no differences ($p > 0.05$) in methane concentrations between the treatments. An

increase ($p < 0.05$) in propionic acid concentration was observed in the *in vitro* ruminal fermentation with β -acids. It was concluded that β -acids could help reduce silage deterioration during the aerobic phase, and their residual effect could improve *in vitro* ruminal fermentation.

CONTENIDO

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xv
LISTA DE GRÁFICAS.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Proceso de elaboración del ensilaje.....	5
Fase 1. Fase Aerobia.....	7
Fase 2. Fase de Fermentación.....	8
Fase 3. Fase Estable	8
Fase 4. Fase de deterioro aerobio.....	8
Características de un buen ensilaje.....	9
Microorganismos no benéficos relacionados con el deterioro del ensilaje expuesto al aire	10
Bacterias acéticas.....	11
Enterobacterias.....	12
Microorganismos esporulados.....	12
Levaduras.....	13
Hongos filamentosos.....	13
Uso de aditivos para mantener la calidad del ensilaje expuesto al aire previo a la alimentación.....	14
Aditivos comerciales u otros.....	14

Empleo de lúpulo o derivados.....	18
Necesidad soluciones económicas y naturales.....	21
Patrón de Ácidos Grasos Volátiles ideal cuando se utiliza lúpulo en el ensilaje.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Ensayo 1. Selección de ensilajes experimentales.....	26
Descripción del área de estudio.....	26
Tratamientos experimentales.....	26
Procedimientos experimentales	26
Análisis estadístico.....	27
Ensayo 2. Fermentación <i>in vitro</i> y crecimiento microbiano:	
Características en la fase aerobia	28
Descripción del área de estudio.....	28
Tratamientos experimentales.....	28
Procedimientos experimentales	29
Análisis estadístico.....	30
Ensayo 3. Fermentación ruminal <i>in vitro</i>	31
Descripción del área de estudio.....	31
Tratamientos experimentales.....	31
Procedimientos experimentales	31
Análisis estadístico.....	33

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Ensilajes: Análisis Bromatológico.....	35
Fermentación in vitro y crecimiento microbiano: Características de la fase aerobia.....	38
Valor de pH.....	38
Recuento microbiano.....	38
Concentraciones de amoníaco.....	40
Concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico.....	43
Fermentación ruminal in vitro.....	48
pH y producción de gases totales, hidrógeno, metano, amoniaco, dióxido de carbono y ácidos grasos volátiles....	48
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
LITERATURA CITADA.....	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Análisis bromatológico de los ensilajes del pasto Maralfalfa	36
2	Conteos de las levaduras durante la incubación en Agar Malta (28 °C de 24 h) del ensilaje con la adición de 0.003 g de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β -ácidos	41
3	Concentración de Amonio del ensilaje con la adición de 0.003g de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β -ácidos.....	42
4	Concentración de Ácido propiónico (mmol/mL) y Ácido acético (mmol/mL) en ensilaje con la adición de 0.003 g de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β -ácidos.....	44
5	Concentración de Ácido butírico (mmol/mL) a las 24h de incubación del ensilaje con la adición de 0.003 g de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β -ácidos.....	46
6	Efecto de lúpulo Chinook, Galena y extracto de β -ácidos en las características de la fermentación ruminal <i>in vitro</i>	50

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Valores de pH del ensilaje con la adición de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β -ácidos 0.003 g para todos los tratamientos.....	39



INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el hombre ha buscado la manera de conservar los alimentos para el ganado durante las épocas de escasez (otoño-invierno) (Isidro *et al.*, 2017). Actualmente existen tres formas de conservar los pastos y forrajes: el ensilado, la henoificación y el henolaje (Cao *et al.*, 2024). El ensilaje es el método de conservación de forrajes más empleado para la alimentación de rumiantes (Ahmed *et al.*, 2023) ya que utiliza pocos aditivos y no se necesita mucha infraestructura (Cao *et al.*, 2024). A grandes rasgos, este método es una fermentación producida por el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL), en la cual la acumulación de ácido láctico conlleva a una disminución del pH, propiciando un ambiente inhóspito para microorganismos no deseados en los procesos de ensilaje y que su presencia en este tipo de alimentos puede provocar una disminución en la calidad de los productos finales de la ganadería (carne y leche).

La fase de fermentación se ha estudiado con mucho detenimiento para mejorar las condiciones del ensilaje y obtener un producto que conserve efectivamente el material vegetal. En ocasiones el material a ensilar tiene muy baja calidad nutricional por lo que con frecuencia se le adicionan otros elementos que le aumentan la calidad al alimento. Este es el caso de la urea que se adiciona para incrementar la disponibilidad de nitrógeno y pueda ser empleado por la microbiota ruminal para la síntesis de proteína microbiana y mayor nutrición del rumiante (Henderson, 1993; Kung Jr *et al.*, 2003; Santos da Silva *et al.*, 2014).



Sin embargo, ensilajes con este tipo de aditivos pueden generar una disponibilidad alta de nutrientes por lo que son más propenso a que sean degradados por microorganismos oportunistas durante la fase aerobia (Ávila & Carvalho, 2020).

Estos microorganismos se encuentran en el material vegetal antes de ensilar y se mantienen latentes hasta que termina el proceso y vuelvan las condiciones ideales para ellos, tal es el caso de las bacterias acéticas, las levaduras y/o las enterobacterias (Jiang *et al.*, 2024). Otros microorganismos indeseables son los formadores de endosporas y los hongos filamentosos que no solo tienen efecto negativo sobre la disponibilidad de nutrientes sino también contaminan los productos finales de la industria ganadera como la carne, la leche y sus derivados, ocasionando graves enfermedades en los consumidores (Driehuis *et al.*, 2018).

Existen aditivos químicos comerciales que mejoran la estabilidad aerobia, los cuales disminuyen las concentraciones de levaduras luego de la exposición al aire de los ensilajes (López *et al.*, 2014). Así mismo, también se emplean BAL heterofermentativas en combinación con BAL homofermentativas como inóculo del ensilaje con buenos resultados (Okoye *et al.*, 2023). Sin embargo, ninguna de estas formas ofrece una alternativa económica para el productor. Por lo tanto, existe la necesidad de generar un ensilaje económico que mejore la estabilidad aeróbica. La utilización de productos naturales con actividad antimicrobiana puede ser una opción viable.



El lúpulo es una planta perenne que se cultiva en el hemisferio norte y su principal uso es en la fabricación de la cerveza por su alto contenido de α -ácidos que le aportan el amargor por ser muy solubles y β -ácidos que tienen capacidad antimicrobiana aportándole estabilidad a la mezcla. Es bien sabido el beneficio del lúpulo en la vida de anaquel de la cerveza, por su capacidad antimicrobiana (Salfer *et al.*, 2020) por lo que es de esperarse que tenga la misma utilidad para evitar el deterioro aerobio del ensilaje. También se ha probado su uso como sustituto del formaldehído en la industria azucarera para evitar contaminaciones en la producción de azúcar con muy buenos resultados (Emerstorfer *et al.*, 2011). Por otro lado, se han realizado estudios para aprovechar las potencialidades del lúpulo como aditivo modulador del crecimiento para los rumiantes para eliminar el uso de ionóforos; y entre los resultados obtenidos se destaca que no altera la microbiota ruminal, incluso se encontraron disminuciones en la producción de metano (Castillo *et al.*, 2019). Por su capacidad antimicrobiana y su poca o nula alteración del ambiente ruminal son factores para tener en cuenta en su utilización como aditivo para el ensilaje mejorando su calidad y aumentando su periodo de utilización.

Por lo expuesto anteriormente, se planteó la siguiente hipótesis: La adición de lúpulo o extracto de lúpulo pueden afectar el crecimiento de los microorganismos que deterioran el ensilaje luego de la exposición al aire sin afectar la fermentación ruminal.



Se definió como objetivo general: Evaluar el efecto del lúpulo o extracto de lúpulo para el mantenimiento de las características del ensilaje una vez expuesto al aire. Para dar cumplimiento al objetivo general se propusieron como objetivos específicos:

- Determinar el crecimiento de bacterias Gram-negativas patógenas, levaduras y hongos filamentosos en el ensilaje expuesto al aire con la adición de lúpulo o extracto de lúpulo.
- Comprobar la disminución la cantidad de butirato en el ensilaje expuesto al aire tratados con lúpulo o extracto de lúpulo.
- Evaluar la fermentación ruminal *in vitro* en el ensilaje con la adición de lúpulo o extracto de lúpulo.



REVISIÓN DE LITERATURA

Proceso de elaboración del ensilaje

La Organización de las Naciones Unidas (ONU), a través de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), proporciona datos sobre la producción ganadera y su impacto en la seguridad alimentaria y el medio ambiente. En 2023, se destacó que la demanda global de carne y productos lácteos sigue en aumento, especialmente en países de ingresos bajos y medios, debido a cambios en la dieta y el crecimiento demográfico. Se proyecta que la producción ganadera aumentará un 1.3% anual hasta 2032, aunque de forma más lenta que en años anteriores debido a las restricciones ambientales y económicas (FAO, 2023).

El cambio climático es un factor que posee un alto grado de influencia, las sequías extremas, el aumento de la temperatura, la escasez de agua, así como otros factores hacen que la disponibilidad de pastos sea cada vez menor para la ganadería. Por lo tanto, desarrollar nuevos recursos forrajeros es una prioridad. para responder a la creciente demanda de productos animales en numerosos países.

Las estaciones del año son otro factor que han llevado al hombre a buscar formas de proveer alimento al animal en las épocas de escasez. Actualmente se conocen diferentes formas de conservación de forrajes, tal es el caso de la henificación, el henolaje y ensilaje, los cuales mediante un proceso adecuado



permiten aprovechar las cualidades nutritivas de los materiales utilizados cuando el alimento se torna escaso (Rubio , 2024).

Henificación: proceso obtenido mediante la evaporación del agua de los tejidos de la planta alcanzando un contenido de humedad de menos del 15 % que inhibe la presencia de hongos, siendo muy utilizada por este motivo (Romero, 2004).

Ensilaje: el principal objetivo es conseguir dentro de la masa ensilada una concentración suficiente de ácido láctico por medio de una rápida disminución del pH. Se considera en la actualidad como el método más utilizado para la conservación de forrajes (Garay *et al.*, 2024).

Henolaje: es una mezcla del proceso de elaboración del ensilaje y la henificación. La humedad se mantiene aproximadamente en torno al 35 %. El forraje se corta y pre-marchita hasta lograr un contenido de materia seca aproximado al 50 %, de allí el material se enrolla y es cubierto con polietileno. Al iniciarse el proceso de fermentación, el oxígeno es consumido rápidamente originando la anaerobiosis, que propicia el desarrollo de bacterias ácido-lácticas, transformando el ácido láctico que ayuda a disminuir el pH hasta 4 (Moore *et al.*, 2023).

De las tres técnicas descritas anteriormente el ensilaje es el método de conservación mayormente empleado puesto que preserva de manera eficiente los nutrientes originales del material y altos contenido de humedad, con la utilización de menor cantidad de suplementación (Mohammadi *et al.*, 2024).



La práctica del ensilaje comenzó hace 3.000 años aproximadamente, en las ruinas de Cartago en África, se descubrieron indicios de forraje que pudieron haber sido ensilados alrededor del año 1200 A.C (Siefers, 2000). El primer ensilaje de forraje verde se llevó a cabo en 1786 en Italia, utilizando toneles de madera para conservar hojas verdes. Más tarde, en 1842, en Londres, comenzó el ensilaje de gramíneas y leguminosas. No fue sino hasta 1873 que esta técnica llegó a Estados Unidos, donde pronto se popularizó, especialmente con el ensilaje de maíz (Valencia, 2016).

El objetivo fundamental era conservar los pastos y los forrajes y almacenar su biomasa con las mínimas pérdidas de nutrientes, aprovechando al máximo los recursos forrajeros existentes para alimentar al ganado en épocas de escases (Valencia, 2016).

Molina *et al.*, en el año 2004 definieron que el proceso de ensilaje es la fermentación anaerobia de los carbohidratos solubles presentes en el forraje para producir ácido láctico por la adición de bacterias epifíticas ácido-lácticas (BAL) y en una menor proporción se produce ácido acético.

El proceso de ensilaje se puede dividir en cuatro etapas (Molina *et al.*, 2004).

1. Fase Aerobia.

Su duración es de unas pocas horas. Los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos presentes en material vegetal disminuyen con rapidez la



concentración de oxígeno atmosférico. Mientras el pH se encuentre en un rango normal 6,5-6,0 se constató que existe actividad de enzimas vegetales.

2. Fase de Fermentación

Luego del consumo del oxígeno en el silo las BAL tendrán las condiciones de crecimiento óptimas convirtiéndose en la población predominante logrando que el pH alcance valores en el intervalo de 5,0-3,8. Esta fase puede durar desde unos días hasta varias semanas.

Los géneros mayormente representados: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20-40 °C para casi todas, son capaces de disminuir el pH hasta valores por debajo 3.0 dependiendo de la especie y el tipo de forraje (Parra, 2010).

3. Fase Estable o Almacenamiento

Si el ambiente se mantiene sin aire ocurren pocos cambios y esta fase puede tener una duración indefinida. El almacenamiento es una fase en la cual se deben tener algunos cuidados para no deteriorar el alimento animal.

4. Fase de Deterioro Aerobio

Para el empleo del ensilaje es necesario la apertura del silo y esto da paso a la última fase en el proceso de ensilaje. Ocurre en todos los ensilajes al ser abiertos, pero puede ocurrir antes por daño de la cobertura del silo (p. ej. roedores o pájaros). El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera etapa 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 (Villacrés, 2017).

Borreani *et al.*, 2013 y Kung Jr *et al.*, 2018 concluyeron que, en zonas templadas el deterioro puede originar pérdidas cercanas al 20 % del total de materia seca almacenada en silos de maíz, sorgo y de grano entero.

Características de un buen ensilaje

Además de disponer de alimentos para el ganado, los productores buscan alternativas mediante la práctica del ensilaje que les permitan que los alimentos sean almacenados y utilizados con facilidad (Persson & Bakken, 2024).

Para una alimentación adecuada de los animales el ensilaje debe cumplir alguna de estas características, deben prevalecer condiciones óptimas para la actividad de las bacterias productoras del ácido láctico (Monroy *et al.*, 2014).

La temperatura debe ser menor de los 30 °C y la humedad relativa entre el 60-70 %. Si la humedad contenida en el forraje es menor de 50 %, será muy difícil prensar el forraje de una manera adecuada.

Tienen como características distintivas (Wagner *et al.*, 2013):

1. Buen color (amarillo, marrón o verduzco)
2. Buen olor (avinagrado)



3. Textura (no babosa)

4. pH de 4.2 o menor

Se debe empacar el forraje de forma compacta para fomentar la fermentación y un ambiente anaerobio. Si el forraje o pasto es picado lo más finamente posible, se podrá comprimir de forma que el aire sea expulsado completamente (Vázquez *et al.*, 2024).

Microorganismos no benéficos relacionados con el deterioro del ensilaje expuesto al aire

El ensilaje es un sustrato propicio para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, debido a la naturaleza del material vegetal utilizado. Muchos de estos microorganismos están asociados con el deterioro del ensilaje, lo que reduce su valor nutritivo para el ganado (McAllister *et al.*, 2018). Sin embargo, el proceso de fermentación que ocurre en el ensilaje ayuda a controlar la actividad microbiana mediante la combinación de un ambiente anaeróbico y un bajo pH (Driehuis, 2013). Por ello, es esencial comprender tanto los microorganismos que participan en el proceso de ensilaje como aquellos que causan su deterioro.

El deterioro aerobio del ensilaje ocurre en dos etapas. En la primera etapa, las levaduras y eventualmente las bacterias ácido-acéticas descomponen los ácidos orgánicos (Liu *et al.*, 2013). Esto provoca un aumento del pH, que inicia la segunda etapa, caracterizada por el aumento gradual de la temperatura y el crecimiento de microorganismos menos tolerantes a los ácidos, como



Clostridium, *Paenibacillus* y *Bacillus* (Borreani *et al.*, 2013). Durante esta etapa, también pueden aparecer hongos, enterobacterias y otros microorganismos aerobios, lo que reduce el valor nutricional del ensilaje y la disponibilidad de sustratos digeribles (Cordiviola, 2020). Las micotoxinas producidas por hongos filamentosos en esta fase representan un riesgo para la salud animal (Driehuis *et al.*, 2018; Pahlow *et al.*, 2003).

Bacterias acéticas

Las bacterias acéticas son Gram-negativas, aerobias y tolerantes a ácidos, pues sobreviven en condiciones de pH muy bajo. Según Parvin & Nishino, (2009), estas bacterias están principalmente presentes durante la fase de utilización del ensilaje en la alimentación del ganado, lo que las vincula con la primera etapa de deterioro. Se sabe que pueden oxidar azúcares y ácido láctico completamente hasta agua y CO₂, y también producir ácido acético al oxidar etanol (Spoelstra *et al.*, 1988). Una vez que se agota el etanol, estas bacterias siguen desarrollándose, utilizando ácido acético. Aunque algunos autores sugieren que la acumulación de ácido acético podría tener efectos antifúngicos a altas concentraciones (Parvin & Nishino, 2009), el consumo de ácidos por estas bacterias favorece el crecimiento de otros microorganismos aerobios, consecuencia indeseada en el proceso de ensilaje. La especie predominante que se pudiera encontrar es *Acetobacter pasteurianus*, aunque también se han identificado especies de *Gluconobacter* (Guan *et al.*, 2018).



Enterobacterias

Las enterobacterias son anaerobias facultativas, ya que algunas especies pueden usar nitrato en lugar de oxígeno como último aceptor de electrones. Su metabolismo versátil permite que produzcan, una amplia variedad de compuestos solo determinado por la especie, ácido láctico, acético y succínico, etanol, 2,3-butanodiol, CO₂ y agua, serían algunos de los principales que encontraríamos. Aunque algunos de estos compuestos pueden ser beneficiosos para conservar el ensilaje, sus concentraciones no suelen ser suficientemente altas para esta función. Debido a que consumen los azúcares disponibles su presencia en el ensilaje indica deterioro, el aumento de estas poblaciones ocasionan competencia con las BAL tanto por nutrientes como por superficie. Provocan una alta tasa de degradación de proteínas, lo que reduce el valor nutritivo y genera productos tóxicos como amoníaco y aminas biogénicas (Pahlow *et al.*, 2003). Aunque muchas de las enterobacterias en el ensilaje no son patógenas, algunas presentan un riesgo potencial, como *Escherichia coli* O157:H7, que produce la toxina shiga (STEC) y ha sido encontrada en la microbiota epifítica de ciertos forrajes (Driehuis *et al.*, 2018; Queiroz *et al.*, 2018).

Microorganismos esporulados

Este grupo incluye bacterias que forman esporas como mecanismo de resistencia a condiciones ambientales adversas, y las especies más comunes en el ensilaje pertenecen a los géneros *Clostridium*, *Bacillus* y *Paenibacillus* (Doyle *et al.*, 2015; Pahlow *et al.*, 2003). Estas estructuras de resistencia pueden soportar todo el paso por el tracto gastrointestinal del animal y pueden llegar a



contaminar productos como la leche, afectando su calidad debido a la producción de toxinas o enzimas (De Jonghe *et al.*, 2010). *Bacillus* spp. compite con las BAL por los carbohidratos, mientras que *Clostridium* spp. al producir ácido butírico, reduce la palatabilidad y el valor nutricional del ensilaje. Altas concentraciones de ácido butírico son un signo importante de la pérdida de la calidad del ensilaje.

Levaduras

Las levaduras pueden prosperar en condiciones ambientales variables y están bien adaptadas para usar el ácido láctico como fuente de carbono en el ensilaje, tolerando tanto la acidez como la falta de oxígeno (Wilkinson *et al.*, 2013). Su crecimiento reduce la materia seca y aumenta el pH, lo que favorece el deterioro del ensilaje. Sin embargo, ciertas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* se utilizan como probióticos y han mostrado buenos resultados como inoculantes en ensilaje (González *et al.*, 2022).

Hongos filamentosos

Estos hongos, como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*, son aerobios estrictos y pueden crecer en el ensilaje tras un deterioro aeróbico extenso. Además de reducir la calidad del ensilaje, estos hongos pueden producir micotoxinas que representan un riesgo para la salud del ganado, tales como aflatoxinas y ocratoxinas (Queiroz *et al.*, 2018). En ensilajes de sorgo en Uruguay se han identificado especies como *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium nygamai* (Cordiviola, 2020), mientras que, en Argentina *Aspergillus* y *Fusarium* son los géneros predominantes (Alpizar, 2015).



Uso de aditivos para mantener la calidad del ensilaje expuesto al aire previo a la alimentación

Durante los últimos años, se ha mejorado mucho la calidad de los procesos de fermentación del ensilaje, desafortunadamente no puede decirse lo mismo de la estabilidad aeróbica de los ensilados durante su apertura y uso. La notable mejoría en la eficiencia de fermentación se tradujo en una disminución del contenido de ácidos grasos volátiles (AGV) que naturalmente tienen actividad antimicótica. Generalmente, los ensilajes bien conservados se consideran más susceptibles al deterioro aeróbico por crecimiento de representantes fúngicos, en comparación con ensilajes que tuvieron procesos de fermentación más pobres (Borges *et al.*, 2011).

La utilización de este tipo de productos como el ácido propiónico, acético, así como otros ácidos orgánicos tiene como objetivo la inhibición de la microbiota que coloniza el ensilaje. Estos pueden tener acción esterilizante directa ya que detienen el crecimiento microbiano de forma inmediata. Y los llamados de acción indirecta tienen un tiempo de acción más prolongado que puede llegar hasta la liberación del producto activo (Pérez, 2011).

Aditivos comerciales u otros

La urea, el benzoato de sodio y el hidróxido de sodio se encuentran entre los aditivos estudiados y en algunos casos empleados, pero los resultados de su aplicación no han sido consistentes en los diferentes estudios (Siqueira *et al.*, 2007; Mari, 2008; Pedroso *et al.*, 2008). Por ello, se han probado diferentes dosis



de aplicación, así como la combinación de aditivos, en busca de una mayor eficiencia de la conservación (Siqueira *et al.*, 2010) .

Un producto que puede generar grandes problemas en la producción porcina son las excretas de estos. Sin embargo se conoce que las excretas de cerdo poseen capacidad amortiguadora cuando son usadas como aditivo para el ensilaje, debido a que mantiene una gradual disminución del pH y un lento crecimiento de bacterias ácido-lácticas. Las poblaciones de lactobacilos que deterioran el ensilaje se mantienen bajo control al competir con la microbiota presente en las excretas del cerdo (López *et al.*, 2014).

López y colaboradores en el 2014 compararon la estabilidad aeróbica en el ensilaje con excretas de cerdos de dos aditivos uno comercial (Toxic-Chec®) y otro no (Ácido propiónico). Al determinar los recuentos de los microorganismos no deseados y compararlos, obtuvieron que la concentración de levadura no fue estadísticamente diferente en los tratamientos evaluados. Sin embargo, se observó una tendencia del ácido propiónico a disminuir el crecimiento de levaduras en este tipo de ensilaje. Las enterobacterias fueron los microorganismos predominantes en el control ($P < 0.05$), ya que presentaron una concentración de 7.6×10^4 UFC/g de ensilaje; mientras que en los tratamientos con adición de Toxic-Chec® y ácido propiónico 2.6×10^4 y 1.6×10^4 UFC/g de ensilaje respectivamente, encontraron menor conteo de estos microorganismos, con diferencia estadística ($P < 0.05$).



Las bacterias heterofermentativas se ha estudiado su uso para el control de deterioro del ensilaje una vez expuesto al aire. En el año 1996 Weinberg & Muck, (1996) demostraron que *Lactobacillus buchneri* era un buen candidato para mejorar la estabilidad aerobia del ensilaje igualmente comprobado por Oude *et al.*, (2001). La capacidad de convertir el ácido láctico en ácido acético de esta bacteria es lo que ha impulsado su uso para conservar el ensilaje en la fase de deterioro aerobio. El ácido acético inhibe en el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras, cuando este es expuesto al aire. La vía que utiliza *L. buchneri* para la producción de ácido acético no es la clásica por mediación de la fosfocetolasa (fermentación heteroláctica), sino que emplea una vía anaerobia alternativa que convierte el ácido láctico en acético y 1,2-propanodiol (Oude *et al.*, 2001).

Zielińska & Fabiszewska, (2018) observaron que hay cepas capaces de metabolizar 1,2-propanodiol a propanol y a ácido propiónico. Varios trabajos demostraron que la inoculación con *L. buchneri* mejora la estabilidad aerobia de los ensilajes en los cuales se emplearon varios cultivos, sin embargo, el efecto es relacionado con la utilización de cepas específicas (Kleinschmit & Kung Jr, 2006) y la dosis empleada (Yıldız, 2024). La combinación de BAL heterofermentativas estrictas y facultativas aporta a los aditivos las ventajas de ambas representantes.

Durante la fermentación, algunas BAL también pueden producir enzimas como esterasa de ácido ferúlico, que aumentan la degradación de la fibra



detergente neutra (Nsereko *et al.*, 2008). Estas BAL han sido incorporadas a los inoculantes para mejorar la digestibilidad del material vegetal (inoculantes de tercera generación) (Guo *et al.*, 2023).

Otras especies como *Streptococcus bovis*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Bacillus spp.* y levaduras, también han sido probadas como posibles inoculantes (Muck *et al.*, 2018).

La microbiología del ensilaje se ha dado a la tarea de encontrar microorganismos con la capacidad de evitar la fermentación butírica, un rápido descenso del pH, la reducción de las poblaciones levaduriformes, detener el proceso de deterioro aerobio, así como mejorar el desempeño animal, para emplearlos como inoculantes microbianos (Cordiviola, 2020).

Ontiveros *et al.*, (2021) emplearon ensilaje de maíz de la planta completa y le inocularon cepas de patógenos zoonóticos para determinar la potencialidad como antimicrobiano a los ácidos grasos de cadena media. Comprobaron que tanto laurato y monolaurina (5 mg/mL) provocaron disminuciones ($P < 0,05$) de 4 a $>7 \log_{10}$ de unidades formadoras de colonias (UFC)·mL⁻¹ en *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis* comparado con los controles.

El 2-nitropropanol (1 mg/mL) disminuyó ($P < 0,05$) *E. faecalis* y *L. monocytogenes* 2,9–3,8 y 2,4–7,2 $\log_{10}$ UFC/mL después de 6 y 24 h de incubación, respectivamente. En ensilaje de maíz de planta entera expuesto al aire, los inhibidores causaron disminuciones, de 0,7 a 2,2 $\log_{10}$ UFC/mL en *L. monocytogenes*, estafilococos y aerobios cultivables después de 24 h de



incubación, las cuales no resultaron significativas, para el caso de las levaduras y hongos filamentosos se apreciaron una disminución muy pequeña ($<0,1-0,3 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) ($P < 0,05$). Las pruebas de efectos de arrastre contra los microorganismos ruminales revelaron que el laurato, la monolaurina y el 2-nitropropanol inhiben la metanogénesis en más de un 50 % ($P < 0,05$) después de 24 h haciéndose evidente la seguridad de este tipo de aditivos para el consumo animal, así como otras potencialidades de estos.

Empleo de lúpulo o derivados

A principios de la década de 1990, los antimicrobianos de origen vegetal se introdujeron en la industria azucarera como una alternativa al formaldehído, con el fin de combatir las bacterias termófilas en el proceso de producción de azúcar. Se encontró que los ácidos beta de lúpulo son una aplicación adecuada para el control del crecimiento microbiano en el área de extracción de azúcar, ya que son bien conocidos por su efecto antimicrobiano y también por su historial comprobado de seguridad en la industria cervecera (Miranda, 2022).

Estos compuestos de lúpulo no se han utilizados en el ensilaje como aditivos para evitar el deterioro aerobio, pero por su capacidad antimicrobiana demostrada se convierten en potenciales aditivos.

El compostaje de heces de pollo es un bioproducto que usualmente es empleado como fertilizante, pero ocasiona la acumulación de fósforo, potasio y nitrógeno tanto en el suelo como en fuentes de agua, sin embargo, las grandes cantidades de nitrógeno que presenta como ácido úrico y urea puede ser utilizada



en la alimentación de rumiantes. El inconveniente es la presencia de bacterias patógenas como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Campylobacter* que deben ser eliminadas antes de la alimentación de los rumiantes (Jeffrey *et al.*, 1998). Se conoce el efecto antimicrobiano de extractos de lúpulo frente a *Clostridium*, *Listeria*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* así como representantes de estos géneros que son híper productoras de amonio, disminuyendo la disponibilidad de urea para los rumiantes. Se ha descrito que el lúpulo reduce la actividad de la ureasa en la conversión de urea a amonio y dióxido de carbono (Keskin *et al.*, 2019), esto retiene la proteína cruda del alimento (Castillo *et al.*, 2023).

Se sabe que los compuestos de lúpulo ejercen algún efecto antimicrobiano, especialmente en bacterias Gram-positivas. Al igual que con muchos otros conservantes, los ácidos beta del lúpulo son ácidos débiles que son más efectivos contra las bacterias en su forma no disociada (Betancur *et al.*, 2023).

El mecanismo de acción de los ácidos amargos del lúpulo se basa principalmente en las secciones hidrofóbicas de sus moléculas (como las cadenas de prenilo y acilo), las cuales interactúan con la pared celular bacteriana. Esta interacción provoca alteraciones en la membrana principal y afecta la homeostasis celular (Magalhaesa *et al.*, 2010). Aunque ciertas bacterias, en particular algunas cepas Gram-negativas, han desarrollado mecanismos de resistencia a los acilfloroglucinoles presentes en el lúpulo (Karabín *et al.*, 2016), algunos de estos compuestos han mostrado efectos sinérgicos con ciertos



antibióticos, en especial contra bacterias Gram-positivas y de manera inesperada, también contra algunas Gram-negativas. Las interacciones más favorables se observaron entre los componentes del lúpulo, especialmente la lupulona, y antibióticos como el sulfato de polimixina B, la tobramicina y la ciprofloxacina. Dado que el modo de acción antibacteriana de estos antibióticos es diferente, su sinergia con la lupulona parece estar relacionada con su capacidad de alterar la integridad de la membrana, facilitando la entrada del antibiótico en la célula y, por ende, aumentando su eficacia (Natarajan *et al.*, 2008). Inesperadamente, la lupulona también mostró una actividad antibacteriana significativa contra varias cepas de bacterias Gram-negativas, incluido *Helicobacter pylori*, incluso en cepas resistentes (Čermák *et al.*, 2015; Ohsugi *et al.*, 1997).

En la industria cervecera, se sabe que las bacterias lácticas (BAL) pueden desarrollar resistencia a compuestos derivados del lúpulo. Este fenómeno podría explicarse porque, a medida que las BAL reducen el pH al inicio de la fermentación, los ácidos hidroxibenzoicos (HBA) se convierten en su forma no disociada, permitiendo que las células bacterianas los reabsorban. Dentro de la célula, los HBA se disocian nuevamente, interfiriendo con el potencial transmembrana necesario para la producción de energía. A diferencia de las BAL resistentes al lúpulo, las células vegetativas no cuentan con mecanismos para defenderse de la actividad antimicrobiana de los HBA, por lo que son inhibidas por los compuestos del lúpulo (Bolton *et al.*, 2019).



Los datos sugieren que no solo las BAL resistentes al lúpulo provenientes de cervezas deterioradas pueden crecer en presencia de HBA, sino también algunas BAL incluidas en aditivos comerciales para ensilaje, que no habían mostrado resistencia al lúpulo previamente. De hecho, el uso combinado de BAL de un inoculante para ensilaje y HBA redujo los niveles de ácido butírico y mejoró la calidad del ensilaje, a pesar de que los valores de pH fueron similares a los de ensilajes en los que solo se añadieron BAL o ningún aditivo (Emerstorfer *et al.*, 2011).

Necesidad de soluciones económicas y naturales

A lo largo de los años, diferentes estudios han abordado diversas estrategias y enfoques para mejorar la calidad del ensilaje y, a su vez, la sostenibilidad de los sistemas de producción.

El artículo de Ramírez *et al.*, (2021) destaca la incorporación de desechos de piña en la alimentación del ganado, sugiriendo que la técnica del ensilaje, combinada con un 10 % de pollinaza, no solo mejora la calidad del ensilaje, sino que también promueve prácticas más amigables con el medio ambiente. Esta propuesta inicial establece un precedente sobre el uso de subproductos en la alimentación animal, sugiriendo que la sostenibilidad puede lograrse a través de la innovación en la alimentación.

Macas, (2013) presenta una interesante y novedosa alternativa alimenticia mediante el ensilaje de subproductos agrícolas, como por ejemplo el rastrojo de



maíz y el suero de leche, dos elementos que hasta ese momento no habían sido considerados en esta práctica.

Posteriormente, García, (2016) concluyó que las mezclas de gramíneas y leguminosas son más beneficiosas para la elaboración de ensilajes, lo cual refuerza la idea de que la diversidad en la dieta del ganado puede contribuir significativamente a mejorar la calidad del ensilaje y, por ende, la salud animal.

Más adelante, Bustamante, (2023), profundiza en las estrategias modernas para la conservación de forrajes en sistemas de producción bovina tropical. El autor enfatiza la importancia de las enzimas fibrolíticas y la estabilidad del producto post-ensilaje, sugiriendo que el aumento de ácidos orgánicos puede ser una solución efectiva para combatir el deterioro aeróbico. Este artículo resalta la necesidad de un enfoque integral que combine la calidad del ensilaje con la nutrición animal, proponiendo un balance adecuado de nutrientes. Un aspecto relevante resaltado por Morales *et al.* (2022) es la evaluación exhaustiva de la calidad bromatológica y organoléptica de los diversos ensilajes, poniendo especial énfasis en el impacto positivo que pueden tener los aditivos, como la melaza y el ácido fórmico. Este artículo proporciona evidencia valiosa en cuanto a cómo la manipulación de los ingredientes y las condiciones de fermentación puede influir directamente en la calidad del producto final, lo cual resulta esencial para contrarrestar el deterioro aeróbico. Por otro lado, Souza *et al.*, (2019) realiza una minuciosa revisión sobre el impacto ambiental de la producción de ensilajes, identificando la minimización de pérdidas como una estrategia clave en aras de



lograr prácticas más sostenibles en la producción ganadera. La investigación sugiere que el uso de aditivos puede ser una solución efectiva para reducir las pérdidas fermentativas, lo cual está en línea con la búsqueda constante de métodos que sean más amigables con el medio ambiente.

Monroy *et al.* (2018) se enfocan directamente en la necesidad de encontrar soluciones económicas y naturales para evitar el deterioro aeróbico del ensilaje, reafirmando así la importancia de buscar alternativas que no solo sean viables desde el punto de vista económico, sino también que sean sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.

Todos estos enfoques no solo persiguen mejorar la calidad del ensilaje, sino que también promueven prácticas más sostenibles en la producción ganadera, generando un impacto positivo a largo plazo en el medio ambiente y en la industria agrícola en general.

Patrón de Ácidos Grasos volátiles ideal cuando se utilizan lúpulos en el ensilaje

El uso de lúpulo en el ensilaje es una estrategia que ha mostrado potencial debido a sus propiedades antimicrobianas, particularmente contra hongos y bacterias indeseables que provocan el deterioro aerobio. Al añadir lúpulo al ensilaje, el patrón de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) ideal que se busca es uno que favorezca la producción de ácidos que contribuyan a la conservación del ensilaje y a la inhibición de microorganismos no deseados.



El primer AGV que esperaríamos encontrar es el ácido acético este ácido tiene propiedades antifúngicas y ayuda a prevenir el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras cuando el ensilaje entra en contacto con el aire, lo cual es común al abrir el silo. Mejorando la estabilidad del ensilaje evitando pérdidas excesivas de materias secas (Mora, 2015).

Las cantidades de ácido propiónico son deseables en pequeñas proporciones y se debe a que este ácido tiene propiedades antifúngicas, y su presencia adicional puede ayudar a estabilizar el ensilaje al contacto con el aire. Aunque no se necesita en grandes cantidades, su presencia junto al ácido acético puede mejorar la estabilidad aeróbica (Reyes *et al.*, 2019).

El ácido butírico es otro AGV que puede estar presente en el ensilaje, sin embargo, es indeseado en el ensilaje, ya que su producción indica actividad de bacterias clostridiales, que pueden reducir la calidad del ensilaje. Los cantidades presentes deben mantenerse en niveles mínimos, ya que un nivel elevado de ácido butírico significa fermentación anaerobia de baja calidad y mayor riesgo de pérdida de nutrientes (Ma *et al.*, 2024).

De esta forma, el patrón ideal con la adición de lúpulo sería con niveles moderados de ácido acético y trazas de ácido propiónico, mientras se evita el ácido butírico. Este perfil ayuda a mantener un pH bajo, inhibe microorganismos perjudiciales y mejora la estabilidad aeróbica del ensilaje al abrir el silo.



El lúpulo, al tener compuestos antimicrobianos naturales (como los ácidos beta), potencia este patrón al dificultar el crecimiento de hongos y bacterias dañinas, especialmente durante el almacenamiento y cuando se expone al aire.



MATERIALES y MÉTODOS

Ensayo 1: Selección de ensilajes experimentales

Descripción del área de estudio. Los ensilajes utilizados en este estudio se prepararon en la Estación de Zootecnia de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, se encuentra en el kilómetro 5 de la carretera Ciudad Victoria-Ciudad Mante, en el Ejido Santa Librada, Tamps, México (latitud 23°43'57"Norte; longitud 99°08'41" Oeste).

Tratamientos experimentales. Se consideraron cuatro ensilajes preliminares diferentes, Ensilajes 1 – 4, 1) Pasto maralfalfa 90 % + Grano de sorgo molido 8 % +Paja de sorgo 2 %; 2) Pasto maralfalfa 85 % + Grano de sorgo molido 12 % + Paja de sorgo 3 %; 3) Pasto maralfalfa 90 % + Grano de sorgo molido 7.63 % +Paja de sorgo 1.63 % + Urea 0.75 %; 4) Pasto maralfalfa 85 % + Grano de sorgo molido 11.44 % +Paja de sorgo 2.44 % + Urea 1.13 %. Realizando 4 repeticiones por cada tratamiento.

Procedimiento Experimental. El pasto maralfalfa se produjo en un clima tropical seco de Ciudad Victoria, Tamaulipas, en el noreste de México. Las coordenadas geográficas son 23°44'06" N y 99°07'51" O, a una altitud de 340 metros sobre el nivel del mar. La cosecha se realizó de forma manual a los 100 días de crecimiento. Posteriormente, las plantas se picaron con un molino de martillos (Swissmex®, modelo 610350, Swissmex-Rapid SA de CV, Lagos de Mano, Guanajuato, México) en trozos de aproximadamente 2 cm de tamaño. En cada tratamiento, los ingredientes principales, grano de sorgo molido, paja de



sorgo (cosechado por productores locales en la región de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México) y urea conteniendo 46 % de nitrógeno (Agrochemical Products, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México) se mezclaron manualmente y se colocaron en recipientes plásticos de 5 L. El contenido se compactó manualmente con una prensa y los frascos se sellaron herméticamente con tapas. Los ensilajes se almacenaron en interiores a temperatura ambiente durante 90 días. Al abrir los frascos, se tomó una muestra de 4 g de ensilaje de cada uno de los cuatro contenedores de réplica por tratamiento, se agregaron 10 mL de agua destilada estéril y la mezcla se agitó en un vórtice durante 10 minutos. Luego se determinó el pH utilizando un medidor de pH (Hannah Instruments, modelo HI 9017, Arvore-Vila do Conde, Portugal). Las muestras de ensilaje se analizaron para proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), cenizas (AOAC, 2023), fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) de acuerdo con la metodología de Van Soest *et al.*, (1991). Para la materia seca (MS), se utilizó un horno de aire forzado (Precision Scientific, GCA Corporation, Chennai, Tamil Nadu, India) a una temperatura de 55-60 °C durante 24 horas. Para la determinación de cenizas, se utilizó un horno de mufla (Thermolyne, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a una temperatura de 550 °C durante 4 horas.

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado para los ensilajes preliminares 1 - 4. Las determinaciones de pH, MS, cenizas, EE, FDN, FDA y PC se compararon mediante un análisis de varianza



completamente aleatorizado con pruebas de rango múltiple de Duncan. El modelo utilizado se muestra en la siguiente ecuación:

$$Y_i = \mu + T_i + \epsilon_{ij} \quad (1)$$

donde Y_i = variable dependiente; μ = media global; T_i = efecto del tratamiento ($i = 1, 2, 3, 4$); y ϵ_{ij} = error experimental.

Ensayo 2. Fermentación *in vitro* y crecimiento microbiano: Características en la fase aerobia

Descripción del área de estudio. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH) ubicada en el Periférico Francisco R. Almada km 1.0 en la ciudad de Chihuahua, Chih., México (latitud 28° 35' 10.9'' norte; longitud 106° 6' 26.6'' oeste; altitud 1440 msnm).

Tratamientos experimentales. Del estudio preliminar de ensilaje, se seleccionó una réplica del Ensilaje 2, que exhibió el pH más bajo ($p < 0,05$) (4,38). Se probaron los efectos de los siguientes tratamientos: 1) Control 4 g de ensilado; 2) 4 g de ensilado + 0,03 g de lúpulo Chinook; 3) 4 g de ensilado + 0,03 g de lúpulo Galena; y 4) 4 g de ensilado + 0,03 g de extracto de β -ácidos (componentes antimicrobianos del lúpulo) (Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburgo, Alemania), se examinaron a las 0, 6 y 24 horas. Las variedades de lúpulo Chinook y Galena fueron donadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Investigación Agrícola, Unidad de Investigación de



Producción Animal Forrajera, Lexington, Kentucky. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento.

Procedimiento experimental. Después de abrir el recipiente plástico, el ensilado se expuso al aire durante 12 horas, simulando la degradación aeróbica durante el tiempo de exposición al aire que puede ocurrir en la producción de alimentos para el ganado. Las mezclas de tratamiento se colocaron en tubos de centrífuga cónicos de 50 mL a los que se agregaron 10 mL de agua destilada estéril, se mezclaron e incubaron aeróbicamente a 37 °C para determinar los efectos sobre el crecimiento de las poblaciones microbianas. De acuerdo con el programa de muestreo, se extrajeron tres tubos por tratamiento, de los cuales se utilizó 1 mL de líquido de muestra para diluciones seriadas en una solución estéril de fosfato de sodio 0,4 M, pH de 6,4, para determinar los efectos sobre el crecimiento de las poblaciones microbianas dentro del ensilaje expuesto al aire.

Las levaduras se sembraron en placas de Petri con Agar Extracto de Malta (BD Difco™, Sparks, MD, EE. UU.) y se incubaron durante 24 horas a 28 °C. Se contaron visualmente las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Los coliformes se sembraron en placas Petrifilm 3M (Minnesota Mining and Manufacturing Company, St. Paul, MN, EE. UU.) y se incubaron a 37 °C. El pH se midió en todos los tiempos de muestreo utilizando un medidor de pH (Hannah Instruments) y la concentración de amoníaco se determinó (Broderick y Kang, 1980) utilizando espectrofotometría UV-Vis (Varioskan Flash v4.00.53, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).



Las concentraciones de ácido butírico, ácido acético y ácido propiónico se determinaron mediante cromatografía de gases con detección de ionización de llama. Para este propósito, se utilizó un cromatógrafo de gases Claurus 400® (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) equipado con una columna capilar Varian CP-wax58 (FFAP) CB (15 m x 0,53 mm, 0,5 µm). La temperatura inicial del horno se elevó a 115 °C, se mantuvo durante un minuto y luego se incrementó a razón de 10 °C por minuto hasta alcanzar 190 °C. En este método, se dieron tres minutos isotérmicos y el gas portador fue helio a una presión constante de 3 psi (Castillo *et al.*, 2017).

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial, siendo los factores el tratamiento de lúpulo aplicado al ensilaje y el tiempo, así como su interacción. Se realizó un análisis de varianza mediante el procedimiento GLM de SAS v9.4 (SAS, 2014). El modelo ajustado incluyó los efectos del tratamiento, el tiempo de fermentación y la interacción entre estos dos factores.

La ecuación para el modelo ajustado fue la siguiente (ecuación 2):

$$Y_i = \mu + T_i + t_j + T_i \times t_j + \epsilon_{ij} \quad (2)$$

donde Y_i = variable dependiente; μ = media global; T_i = efecto del tratamiento ($i = 1, 2, 3, 4$); t_j = tiempo (1, 2, 3); $T_i \times t_j$ = interacción tratamiento x tiempo; y ϵ_{ij} = error experimental.



Se analizaron las diferencias en log₁₀ UFC/mL medidas en cada tiempo de muestreo para microorganismos, y las acumulaciones de amonio y ácido butírico para determinar los efectos del tratamiento utilizando un análisis de varianza completamente aleatorizado con separación de medias por diferencia mínima significativa (LSD).

Ensayo 3. Fermentación ruminal *in vitro*

Descripción del área de estudio. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH) ubicada en el Periférico Francisco R. Almada km 1.0 en la ciudad de Chihuahua, Chih., México (latitud 28° 35' 10.9'' norte; longitud 106° 6' 26.6'' oeste; altitud 1440 msnm).

Tratamientos experimentales. Se probaron los efectos de los siguientes tratamientos: 1) Control 4 g de ensilado; 2) 4 g de ensilado + 0,03 g de lúpulo Chinook; 3) 4 g de ensilado + 0,03 g de lúpulo Galena; y 4) 4 g de ensilado + 0,03 g de extracto de β -ácidos (componentes antimicrobianos del lúpulo) (Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburgo, Alemania), se examinaron a las 24 horas. Las variedades de lúpulo Chinook y Galena fueron donadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Investigación Agrícola, Unidad de Investigación de Producción Animal Forrajera, Lexington, Kentucky. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento.

Procedimiento experimental. Para la fermentación ruminal *in vitro*, la muestra restante de los tubos del Ensayo 3 a las 24 horas se secó en un horno



a 65 °C durante 24 horas, se molió en un molino eléctrico (Thomas-Wiley Laboratory Mill, Modelo 4, Thomas Scientific, Chadds Ford, PA, EUA) para pasarlo por un tamiz de 1,0 mm. Se utilizaron tubos de ensayo de 18 mL en los que se mezclaron 0,02 g de ensilaje con aditivos según los tratamientos experimentales (Control, Chinook, Galena y extracto de β -ácidos). El inóculo microbiano ruminal se obtuvo de tres novillas Holstein con un peso promedio de $350 \pm 1,5$ kg, previamente alimentadas durante 7 días con ensilaje de maíz y agua *ad libitum*. El líquido ruminal se extrajo por sonda esofágica antes de la primera alimentación (8:00 am), se recolectó en un termo precalentado a 39 °C y sellado herméticamente, y fue transportado al laboratorio donde se filtró a través de muselina, siempre bajo una corriente de CO₂. Luego, el inóculo se distribuyó anaeróbicamente (10 mL/vial) bajo una corriente de CO₂ libre de O₂ y los viales se sellaron inmediatamente e incubaron durante 24 horas a 110 rpm y 39°C en una Incubadora Orbital Shaker (New Brunswick Modelo Innova 4000, Nijmegen, Holanda). Adicionalmente, se prepararon tres viales sin sustrato como controles en blanco. Todos los animales utilizados en este estudio fueron cuidados de acuerdo con el Reglamento Interno de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencia Animal y Ecología de la UACH (2018). La composición química del ensilaje suministrado a los animales donantes fue la siguiente: 93,81 % MS, 7,07 % PC, 2,72 % EE, 53,63 % FDN, 30,53 % FDA y 10,58 % cenizas, pH 4,38.

Después de 24 horas de incubación, los viales se colocaron en hielo para detener el proceso de fermentación y proceder al análisis de las muestras. La



producción total de gas se midió (mmol/mL) utilizando un transductor de presión FESTO® (Siemens, Munich, Alemania). Posteriormente, se tomó 1 mL de muestra de gas de cada tubo para determinar su composición mediante un cromatógrafo de gases GOW-MAC serie 580 (GOW-MAC Instrument Co., Bethlehem, PA, USA) equipado con una columna empaquetada Carbosphere®, 80/100. 5682PC. Se utilizó nitrógeno como gas portador a un caudal de 20 mL/min y se determinaron los niveles (mmol/mL) de hidrógeno, metano y dióxido de carbono. Las concentraciones molares de AGV se determinaron mediante cromatografía de gases con detección de ionización de llama, siguiendo el procedimiento descrito previamente (Castillo *et al.*, 2017).

El pH se midió con un potenciómetro (Hannah Instruments) y las concentraciones de amoníaco se determinaron siguiendo la técnica descrita por (Broderick & Kang, 1980) mediante espectrofotometría UV-Vis (Varioskan Flash, Thermo Scientific v4.00.53).

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado para evaluar los tratamientos de lúpulo aplicados. El análisis de varianza se realizó utilizando el procedimiento GLM de SAS v9.4 (SAS, 2014). Se analizaron la determinación del pH y las acumulaciones netas de ácidos acético, propiónico y butírico, así como de hidrógeno y metano, para evaluar los efectos del tratamiento del lúpulo mediante pruebas de rango múltiple de Duncan. El modelo se describe mediante la siguiente ecuación:

$$Y_i = \mu + T_i + \epsilon_{ij} \quad (3)$$



donde Y_i = variable dependiente; μ = media general; T_i = efecto del tratamiento
($i = 1,2,3,4$); y ϵ_{ij} = error experimental.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensilajes: Análisis Bromatológico

El tratamiento 3 presentó el pH más alto ($p < 0,05$) en comparación con los otros tratamientos, seguido por los ensilajes sin urea (ensilajes 1 y 2), que no difirieron ($P > 0,05$) entre sí (Cuadro 1). El pH es un indicador de la acidez del ensilaje, la producción de ácido láctico por las BAL permite que el material vegetal ensilado conserve los nutrientes por más tiempo, evitando el crecimiento de microorganismos que degraden estos nutrientes (Santos *et al.*, 2014). El incremento del pH observado en los tratamientos 3 y 4 puede ser consecuencia de la adición de urea, ya que su reacción con el agua produce hidróxido de amonio elevando el pH de la mezcla (Callejo, 2019).

Cabe señalar que el pasto maralfalfa tiene un alto contenido de agua en su composición química que mejora la etapa fermentativa del ensilaje, pero a su vez provoca un aumento en la proliferación de microorganismos no deseados, restándole valor nutritivo al alimento (Sánchez *et al.*, 2024).

El ensilaje 1 exhibió un contenido de MS más alto ($P < 0,05$) que el Ensilaje 3. Para el caso del contenido de FDA el ensilaje 3 presentó un más alto ($P < 0,05$). Se obtuvieron valores menores de fibra detergente ácida en los tratamientos 1 y 2, esto se traduce en cantidades superiores a carbohidratos solubles a ser metabolizados por los microorganismos, mejorando la calidad del



Cuadro 1. Análisis bromatológico de los ensilajes del pasto Maralfalfa

	Tratamiento				SEM	Valor p
	T1	T2	T3	T4		
pH	6.08 ± 0.09 ^b	6.00 ± 0.15 ^b	8.19 ± 0.03 ^a	5.06 ± 0.04 ^c	0.13	<0.01
Materia seca %	96.49 ± 0.03 ^a	95.61 ± 0.02 ^{ab}	95.59 ± 0.11 ^b	95.32 ± 0.06 ^{ab}	0.48	0.04
Humedad %	3.47 ± 0.03 ^b	3.79 ± 0.02 ^b	4.41 ± 0.11 ^a	4.68 ± 0.06 ^a	0.09	<0.05
Ceniza %	10.49 ± 0.10 ^b	10.21 ± 0.12 ^b	12.44 ± 0.08 ^a	11.81 ± 0.08 ^a	0.68	<0.05
Extracto etéreo %	2.66 ± 0.02 ^{NS}	2.65 ± 0.02 ^{NS}	3.65 ± 0.03 ^{NS}	2.68 ± 0.06 ^{NS}	0.22	0.07
Proteína Cruda %	8.92 ± 0.12 ^b	5.71 ± 0.12 ^c	6.67 ± 0.13 ^c	11.91 ± 0.11 ^a	0.61	<0.01
FDN %	61.87 ± 0.06 ^{NS}	56.75 ± 0.13 ^{NS}	63.99 ± 0.23 ^{NS}	61.75 ± 0.08 ^{NS}	14.00	0.09
FDA %	37.54 ± 0.05 ^{ab}	29.87 ± 0.14 ^b	42.43 ± 0.37 ^a	38.51 ± 0.02 ^{ab}	11.29	<0.05

Nota: Medias en la misma fila con las letras minúsculas distintas son estadísticamente diferentes (P < 0.05).



alimento. Para el caso de la fibra detergente neutro los resultados no fueron significativos, pero se encuentran entre 44.0 a 71.9 %, valores establecidos para este tipo de ensilaje que contiene sorgo (Núñez *et al.*, 2010).

Para ensilajes con pasto maralfalfa el contenido de fibra detergente ácida suele rondar el 46 % (Sánchez *et al.*, 2024) los valores obtenidos en nuestro estudio revelan una mayor fermentación del alimento, esto pudiera ser debido a la acción de bacterias y hongos capaces de degradar los carbohidratos estructurales de la pared celular (Morales *et al.*, 2014).

El Ensilaje 4 mostró un contenido de PC más alto ($P < 0,05$) que los otros tratamientos, seguido por el Ensilaje 1. Como era de esperar, en los tratamientos 3 y 4 se evidenció un aumento del nitrógeno (Cuadro 1) junto con el aumento de las concentraciones de urea (Herrera *et al.*, 2016). Lo que implica que una vez consumido el alimento por el animal existirá mayor disponibilidad de este nutriente para la microbiota ruminal y la síntesis de proteína verdadera. El contenido de PC más bajo ($P < 0,05$) se observó en los Ensilajes 2 y 3, que no difirieron ($P > 0,05$) entre sí. No se encontró efecto del tratamiento ($P > 0,05$) para el contenido de EE y FDN. La adición de urea no modificó la MS, la ceniza y el EE, resultados similares a los obtenidos por Santos *et al.*, (2014).



Fermentación *in vitro* y crecimiento microbiano: Características en la fase aerobia

Valores de pH

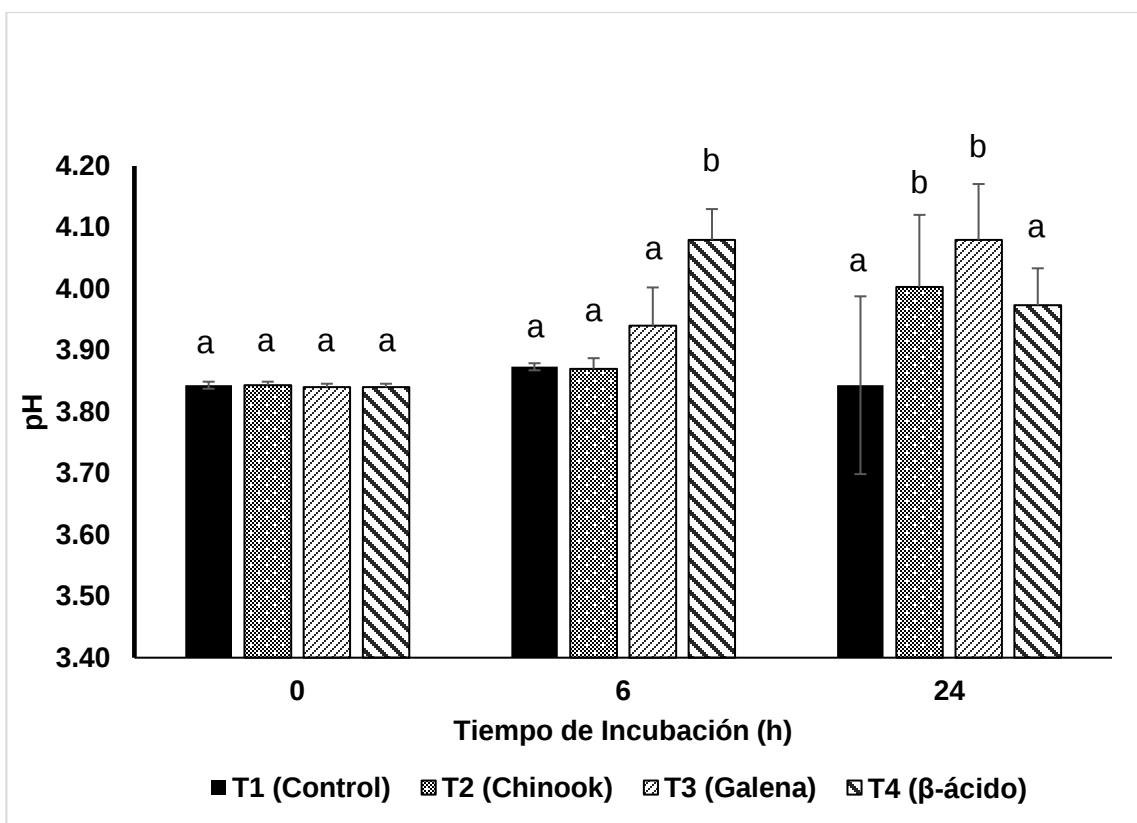
En el tratamiento con β -ácidos a las 6 horas, el pH aumentó ($P < 0,05$) en comparación con el Control, mientras que los otros tratamientos (Galena y Chinook) no mostraron incrementos significativos ($P > 0,05$).

A las 24 horas, el Control presentó un pH menor ($P < 0,05$) en comparación con los tratamientos Chinook y Galena (Gráfica 1). El incremento de pH observado a las 24 horas en los tratamientos de Chinook o Galena puede deberse a que las concentraciones de β -ácidos que contienen estas variedades, estas concentraciones varían entre las especies de lúpulo y siempre serán menores al extracto de β -ácidos empleado en el estudio.

Estos resultados se relacionan con los conteos de levaduras obtenido para los tratamientos evaluados. El incremento observado se mantiene en valores ácidos, lo que asegura la actividad antimicrobiana de las lupulonas. Es conocida que esta molécula tiene mayor eficacia en condiciones ácidas a diferencia de las alcalinas (Castillo *et al.*, 2023).

Recuentos microbianos

No se observó crecimiento de *E. coli*/Coliformes en ninguno de los tratamientos evaluados (datos no mostrados).



Gráfica 1. Valores de pH del ensilaje con la adición de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β-ácidos 0.003 g para todos los tratamientos (P = 0.0002, EE= 0.00445).



El crecimiento de las levaduras en la fase de deterioro aerobio de los ensilajes evaluados se muestra en la Cuadro 2. No fue encontrado efecto sobre el crecimiento de levaduras en agar Malta entre los tratamientos de lúpulo aplicados y el tiempo evaluado en el experimento 2. Los tratamientos Control, Chinook y Galena tuvieron valores estadísticamente similares entre ellos ($P > 0.05$). Los resultados obtenidos revelan que el ensilaje tratado con el extracto de β -ácidos mantuvo controladas las poblaciones de levaduras, disminuyendo los conteos a la mitad durante los tiempos de incubación evaluados, resultados descritos por (Bocquet *et al.*, 2018). Sin embargo, no están definidas las concentraciones para estos microorganismos, discrepando de Siragusa *et al.*, (2008) que reporta que el lúpulo no posee actividad antifúngica.

En el caso del tiempo todos los horarios de muestreo fueron diferentes estadísticamente. Se evidencia el aumento de las poblaciones de levaduras en el tiempo, siendo el menor la hora 0 y los mayores conteos obtenidos fueron a las 24 horas ($P < 0.05$, Cuadro 3).

Concentraciones de amoníaco

No se encontró interacción ($P = 0,16$) entre la adición de lúpulo y β -ácidos y los tiempos evaluados en el estudio (Cuadro 3). El tratamiento de lúpulo Galena mostró la concentración de amoníaco más alta ($P < 0,05$) en comparación con el Control y Chinook. El tratamiento Control mostró el valor más bajo ($P < 0,05$) en



comparación con los tratamientos Galena y β -ácidos. Los valores obtenidos en nuestro estudio evidencian un aumento en las concentraciones de N para todos

Cuadro 2. Conteos de las levaduras durante la incubación en Agar Malta (28 °C de 24 h) del ensilaje con la adición de 0.003 g de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β -ácidos (P= 0.0019, EE = 0.11132).

	Levaduras (UFC/mL)	SEM	Valor de p
Tratamiento			
Control	1.19 ± 0.69 ^a	0.78	0.0019
Chinook	1.08 ± 0.55 ^a		
Galena	1.01 ± 0.61 ^a		
β-ácido	0.53 ±0.21 ^b		
Tiempo			
0	0.5 ± 0.04 ^c	2.23	<.0001
6	1.03 ±0.46 ^b		
24	1.41 ± 0.7 ^a		

Nota: Medias con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05)



Cuadro 3. Concentración de Amoníaco del ensilaje con la adición de 0.003 g de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β -ácidos ($p= 0.0018$ tratamiento, $P= 0.0459$ tiempo $EE= 0.783887$).

	Conc. de amoníaco (mmol/mL)	SEM	Valor de p
Tiempo			
0	7.72 ± 0.9 ^b	0.18	0.0459
6	8.25 ± 0.13 ^a	0.03	
24	8.32 ± 0.58 ^a	0.12	
Tratamiento			
Control	7.58 ± 0.56 ^c	0.11	0.0018
Chinook	7.83 ± 0.53 ^{bc}	0.11	
Galena	8.69 ± 0.69 ^{ab}	0.14	
β-ácido	8.29 ± 0.06 ^a	0.01	

Nota: Medias con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)



los tratamientos respecto al control, evidenciando una mayor proteólisis en todos los tratamientos con lúpulo, optimizando así las características del ensilado y aportando mayor cantidad de péptidos y aminoácidos para ser utilizados por la microbiota ruminal y (Bernal *et al.*, 2008) por el animal. Esto mejora la calidad de los productos finales como la leche y la carne (Rodríguez *et al.*, 2007).

Para el factor tiempo, la concentración más baja ($P < 0.05$) se observó para el tratamiento a las 0 horas. Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos a las 0 horas en comparación con las 6 y 24 horas (Cuadro 3).

Las concentraciones de proteína cruda en el ensilaje deben rondar entre el 5 % y 7 %, valores mayores a este entre el 10 y 15 % solo son esperados en ensilados con pastos como la alfalfa, debido a la alta disponibilidad de proteína soluble que podemos encontrar en estos (Basurto, 2020). El pasto maralfalfa también posee un valor de proteína por encima de 7 %, por lo tanto, nuestros resultados son consistentes con lo registrado en la literatura (González, 2015).

Concentraciones de ácidos acético, propiónico y butírico

Para los ácidos acético y propiónico, no se encontró interacción entre los tratamientos de lúpulo evaluados y el tiempo. Se puede ver que no hubo diferencias significativas en la concentración de ácidos acético o propiónico para los tratamientos evaluados (Cuadro 4). Para el factor tiempo en el ácido acético, se determinó que no hubo diferencias significativas entre las 0 y 6 horas ($P > 0.05$) (Cuadro 4). A las 24 horas, se obtuvo el valor más bajo de ácido acético,



Cuadro 4. Concentración de Ácido propiónico y ácido acético a las 0, 6, 24h de incubación del ensilaje con la adición de 0.003 g de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β -ácidos ($p= 0.0004$ EE= 0.06135309).

	Ácido propiónico (mmol/mL)	SEM	Valor de p
Tratamiento			
Control	0.61 ±0.26 ^{NS}	0.02	0.72
Chinook	0.76 ± 0.44 ^{NS}		
Galena	0.65 ± 0.26 ^{NS}		
β-ácido	0.7 ± 0.18 ^{NS}		
Tiempo			
0	0.77 ± 0.21 ^a	0.4	0.005
6	0.85 ± 0.32 ^a		
24	0.43 ± 0.61 ^b		
Ácido acético (mmol/mL)			
Tratamientos			
Control	3.43 ± 3.67 ^{NS}	2.40	0.68
Chinook	4.74 ± 4.67 ^{NS}		
Galena	3.42 ± 3.63 ^{NS}		
β-ácido	3.61 ± 3.48 ^{NS}		
Tiempo			
0	8.01 ±1.46 ^a	11.17	<.0001
6	2.50 ± 3.2 ^b		
24	0.89 ± 0.61 ^b		



Nota: Medias con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

estadísticamente diferente a los otros puntos de tiempo ($P < 0.05$). Dicha disminución pudiera estar relacionada con la transformación del ácido acético a ácido butírico como consecuencia de la presencia de nitritos en el pasto maralfalfa para la realización del ensilaje (Wróbel *et al.*, 2023) .

Por otro lado, la concentración de ácido propiónico disminuyó cuatro veces con el tiempo, entre las 0 y 6 horas ($P > 0.05$) (Cuadro 4). A las 24 horas, fue la concentración más baja y fue estadísticamente diferente a los otros puntos de tiempo ($P < 0.05$).

La producción de ácido butírico en el ensilaje está dada en su mayoría por bacterias esporuladas entre las que podemos encontrar géneros como *Clostridium sp*, *Bacillus sp* y *Paenibacillus sp* (Pahlow *et al.*, 2003; Doyle *et al.*, 2015). Este ácido graso volátil de cadena corta (AGV) no aparece comúnmente en los ensilados de buena calidad. En la literatura científica podemos encontrar autores que reportan la alta probabilidad del ensilaje de pasto maralfalfa a ser degradado por *Clostridium sp* (Sánchez *et al.*, 2024). En el cuadro 5 se observa el efecto de los tratamientos y tiempos evaluados para la concentración de ácido butírico en el ensilaje expuesto al aire. El tratamiento con lúpulo Chinook presentó una disminución ($P < 0.05$) en la concentración molar de ácido butírico a las 6 horas, que persistió hasta las 24 horas siendo esta la más baja observada. La segunda concentración más baja fue mostrada por β -ácidos; sin embargo, no fue diferente ($P > 0.05$) en comparación con los tratamientos de control y Galena.



Cuadro 5. Concentración de Ácido butírico (mmol/mL) a las 24h de incubación del ensilaje con la adición de 0.003g de lúpulo var. Chinook, lúpulo var. Galena y β -ácidos ($P= 0.0188$ $EE= 0.02071567$).

Tratamiento	Tiempo			SEM	Valor de p
	0	6	24		
Control	0.37 ± 0.01^a	0.14 ± 0.06^{ab}	0.16 ± 0.01^{ab}	0.01	0.0005
Chinook	0.37 ± 0.01^a	0.24 ± 0.22^b	0.01 ± 0.0003^b		
Galena	0.37 ± 0.01^a	0.04 ± 0.01^b	0.23 ± 0.02^a		
β -ácido	0.37 ± 0.01^a	0.29 ± 0.25^a	0.14 ± 0.18^{ab}		

Nota: Medias con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)



El tratamiento que empleó Galena a las 6 horas mostró la concentración más baja ($P < 0,05$) de ácido butírico, pero esta aumentó 5 veces a las 24 horas. Altas concentraciones provocan el rechazo del alimento por el animal, además de considerarse un ensilado con bajo contenido de energía y de proteína por la degradación de esta presente en el forraje originalmente. Basurto (2020), estableció que la concentración máxima era de 0.5 mmol/mL para considerar un ensilaje de buena calidad.

Las concentraciones obtenidas no superaron este valor para ninguno de los tratamientos evaluados, lo que sugiere la ausencia de bacterias capaces de producir ácido butírico (Castillo *et al.*, 2023). El ensilaje evaluado tiene una baja concentración de ácido butírico en el tratamiento con la adición de Galena ($0.2287 \text{ mmol/mL} \pm 0.0035$) siendo el valor máximo obtenido sin superar el límite establecido, el efecto en este parámetro aún no se encuentra del todo claro.

A las 6 horas, el ácido butírico del tratamiento Control fue similar ($P > 0.05$) a los β -ácidos, Galena y Chinook. La disminución observada en el tratamiento de control a lo largo del tiempo no fue diferente ($P > 0,05$) en comparación con el punto de tiempo de la hora 0.



Emerstorfer *et al.*, (2011) empleando 50-100 mg de Beta-Stab10A® (solución acuosa de β -ácidos) en el ensilaje de pulpa de betabel prensada con contaminantes del suelo encontró una disminución significativa de ácido butírico.

Fermentación ruminal *in vitro*

pH y producción de gases totales, hidrógeno, metano, amoníaco, dióxido de carbono y AGV

Los parámetros de la fermentación ruminal *in vitro* no se vieron afectados por la adición de lúpulo, ni el extracto de β -ácidos, factor importante para tener en cuenta para utilización de este tipo de compuestos en los ensilajes. Las características de la fermentación ruminal *in vitro* a las 24 h de los ensilajes estudiados en cuanto a pH, producción de gases totales, producción de hidrógeno (H_2), producción de metano (CH_4) y concentraciones de gas amoníaco (Cuadro 6) no mostraron diferencias ($P > 0.05$) en los tratamientos evaluados.

Sin embargo, existen inconsistencias entre los diferentes ensayos realizados por la comunidad científica en cuanto al efecto del lúpulo como modificador de la fermentación ruminal, en gran medida están dadas por la variedad de la planta, la edad de la planta, la región de cultivo, las condiciones de almacenamiento, entre otros factores que se deben tener en cuenta a la hora de extraer el aceite esencial de la planta o el procesamiento de esta (Klein *et al.*, 2013).

Se conoce que los β -ácidos pueden controlar las poblaciones bacterianas que pudieran provocar acidosis en animales con dietas altas en carbohidratos



según Flythe & Harlow, (2019), siendo una estrategia para evitar problemas metabólicos en el animal, todo debido a la capacidad de estos ácidos de actuar como ionóforos. En el 2008 García *et al.*, utilizaron lúpulo adicionado a la fermentación ruminal in vitro empleando un sustrato compuesto por heno de



Cuadro 6. Efecto de lúpulo Chinook, Galena y extracto de β -ácidos en las características de la fermentación ruminal *in vitro*

	Tratamientos				SEM	Valor de P
	Control	Chinook	Galena	β -ácidos		
pH	7.39 $\pm$ 0.0800	7.35 $\pm$ 0.0900	7.44 $\pm$ 0.624	7.45 $\pm$ 0.529	0.07	0.363
Producción total de gas, mL	11.5 $\pm$ 0.228	11.1 $\pm$ 0.373	10.2 $\pm$ 1.14	9.69 $\pm$ 0.854	1.12	0.213
Hidrogeno, μ mol/mL	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.011 $\pm$ 0.0190	0.000 0.000	0.009	0.441
Metano, μ mol/mL	15.0 $\pm$ 0.298	15.4 $\pm$ 0.192	14.7 $\pm$ 0.712	15.7 $\pm$ 0.249	2.54	0.770
Dióxido de carbono, mmol/mL	31.9 $\pm$ 0.345 ^{ab}	33.6 $\pm$ 0.268 ^a	28.4 $\pm$ 1.15 ^b	26.9 $\pm$ 0.864 ^b	3.26	0.046
Amoníaco, μ mol/mL	7.58 $\pm$ 0.113	7.83 $\pm$ 0.107	8.69 $\pm$ 0.139	8.29 $\pm$ 0.0122	2.82	0.085
Ácido acético, μ mol/mL	9.64 $\pm$ 0.193	8.82 $\pm$ 1.22	16.9 $\pm$ 0.459	30.7 $\pm$ 0.874	5.43	0.088
Ácido propiónico, μ mol/mL	0.702 $\pm$ 0.127 ^b	1.04 $\pm$ 0.056 ^b	1.76 $\pm$ 0.668 ^b	6.02 $\pm$ 0.261 ^a	1.07	0.020
Ácido butírico, μ mol/mL	0.261 $\pm$ 0.008	0.485 $\pm$ 0.086	0.791 $\pm$ 0.284	1.88 $\pm$ 0.080	0.19	0.068
Relación C2:C3	7.16 $\pm$ 0.022	8.27 $\pm$ 0.151	13.2 $\pm$ 0.650	5.10 $\pm$ 0.156	16.9	0.363

Nota: Medias con letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05)



alfalfa, heno de hierba y grano de cebada, con 0.7 g de lúpulo y no obtuvieron ningún cambio en la producción de gas. Por otro lado, Lavrenčič *et al.*, (2015) al emplear una ración totalmente mezclada obtuvieron disminuciones en la producción de gases, al igual que Staerfl *et al.*, (2010) que encontraron solo una ligera disminución en la producción de gas de 24 h cuando se agregaron conos de lúpulo en concentraciones de 75 y 150 g/kg de sustrato de MS a una dieta que consistía en ensilaje de maíz, harina de soja y grano de trigo. Las diferencias entre los estudios pueden estar dadas por el empleo de cantidades diferentes de lúpulo.

El tratamiento con mayor concentración de CO₂ fue el lúpulo Chinook (Cuadro 6); sin embargo, no hubo diferencias ($P > 0.05$) en comparación con el Control. Los tratamientos Galena y β-ácidos tuvieron concentraciones menores al control, a pesar de que esta disminución tuvo significancia ($P > 0.05$). Resultados que se corresponden con los obtenidos por Gülümser *et al.*, 2024 en su estudio empleando una mezcla de lúpulo y ensilaje de alfalfa, en el cual encontraron que a medida que aumentaban las concentraciones de lúpulo se obtenían valores más bajos de CO₂, al igual que para los valores de CH₄.

Las concentraciones de los ácidos grasos volátiles de la fermentación ruminal *in vitro* de los ensilajes en estudio se muestran en el Cuadro 6. Los valores de las concentraciones de acetato y butirato no tuvieron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$).



Mientras que, para el propionato, el tratamiento con β -ácidos mostró la mayor concentración con respecto a los otros tratamientos ($P < 0.05$). Sin embargo, entre los tratamientos Control, Chinook y Galena fueron similares ($P > 0.05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con relación a la proporción de acetato/propionato para los diferentes tratamientos evaluados ($P > 0.05$). Las variaciones que podemos encontrar en los AGV al utilizar los metabolitos secundarios de lúpulo no están totalmente esclarecidas en la literatura científica (Lavrenčič *et al.*, 2015). El aumento significativo del propionato está ligado al mayor efecto antimicrobiano del lúpulo por bacterias Grampositivas, favoreciendo el crecimiento de géneros Gramnegativos como *Prevotella sp.* Este género tiene una gran presencia en el rumen y tiene gran versatilidad a la hora de metabolizar carbohidratos produciendo grandes cantidades de propionato que pueden ser utilizadas por el animal para la gluconeogénesis, aumentando indicadores productivos como son la carne y la leche (Betancur *et al.*, 2022). En el tratamiento control, las cantidades de propionato son bastante pequeñas y muy similares a las obtenidas en los tratamientos con Chinook y Galena ($P > 0.05$); sin embargo, en el tratamiento con β -ácidos la cantidad aumento seis veces con respecto al resto. La explicación estaría en que la concentración de los β -ácidos en las variedades Chinook y Galena peletizadas es menor que en el extracto. Esta pudiera ser una estrategia para aumentar indicadores productivos y a la vez disminuye la disponibilidad de hidrógeno para la síntesis de metano (Flythe *et al.*, 2017) (Flythe & Harlow, 2019).



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La adición de urea en las concentraciones probadas incrementa la cantidad de nitrógeno en los ensilajes, además el aumento en la cantidad de grano de sorgo reduce el pH en forma evidente en ensilajes con urea.

Los resultados de este estudio revelan que pudiera ser efectivo el empleo de extractos de β -ácidos para el reducir el deterioro del ensilaje una vez expuesto al aire. En este estudio se exhibió que los β -ácidos en los ensilajes tratados podría tener efecto residual favoreciendo la producción de propionato en la fermentación ruminal.

Sin embargo, se recomienda la realización de estudios subsecuentes para determinar la dosis adecuada para obtener resultados óptimos en la producción, así como realizar estudios *in vivo* para tener una mejor comprensión del efecto del lúpulo en la fermentación ruminal.



LITERATURA CITADA

- Ahmed, M. G., Al-Sagheer, A. A., El-Waziry, A. M., El-Zarkouny, S. Z., & Elwakeel, E. A. (2023). Ensiling Characteristics, In Vitro Rumen Fermentation Patterns, Feed Degradability, and Methane and Ammonia Production of Berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) Co-Ensiled with Artichoke Bracts (*Cynara cardunculus* L.). *Animals*, 13(9), 1543. <https://doi.org/10.3390/ani13091543>
- Alpízar Solís, C. (2016). Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. Artículo de Revisión. *Rev. Ciencias Vet.* 33, 7; doi:10.15359/rcv.33-1.1Ávila, C. L. S., & Carvalho, B. F. (2020). Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 966–984. doi: [10.1111/jam.14450](https://doi.org/10.1111/jam.14450)
- Basurto, V. M. (2020). Cuál es el significado de los análisis de los ensilados. *BMeditores*. <https://bmeditores.mx/ganaderia/revistas/agosto-septiembre-2018/>
- Bernal L, Á. P., Ramírez, G., Lascano, C. E., Tiemann, T., & Hess, H. (2008). Degradación de nutrientes y emisión de gases al fermentar ensilaje y heno de *Calliandra calothyrsus* y *Vigna unguiculata* en el sistema Rusitec. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*, 16, 199–204. ISSN: 1022-1301.
- Betancur, M., López, J., & Salazar, F. (2023). Antimicrobial activity of compounds from hop (*Humulus lupulus* L.) following supercritical fluid extraction: An overview. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 83(4), 499–509. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392023000400499>
- Betancur-Murillo, C. L., Aguilar-Marín, S. B., & Jovel, J. (2022). *Prevotella*: A key player in ruminal metabolism. *Microorganisms*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010001>
- Bolton, J. L., Dunlap, T. L., Hajirahimkhan, A., Mbachu, O., Chen, S.-N., Chadwick, L., Nikolic, D., van Breemen, R. B., Pauli, G. F., & Dietz, B. M. (2019). The multiple biological targets of hops and bioactive compounds. *Chemical Research in Toxicology*, 32(2), 222–233. doi:10.1021/acs.chemrestox.8b00345
- Borges, J. A., Bastardo, Y., Sandoval, E., Barrios, M., & Ortega, R. (2011). Efecto de la adición de urea y el tipo de fermentación en la estabilidad de silajes de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). *Zootecnia Tropical*, 29(3), 283–292. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692011000300004&lng=es&tlng=es



- Borreani, G., Dolci, P., Tabacco, E., & Cocolin, L. (2013). Aerobic deterioration stimulates outgrowth of spore-forming *Paenibacillus* in corn silage stored under oxygen-barrier or polyethylene films. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 5206–5216. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6649>
- Broderick, G. A., & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63(1), 64–75. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)82888-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8)
- Bustamante Piedrahita, D. R. (2023). Métodos de conservación de forraje para la alimentación de ganado bovino, en la época seca (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2023). <http://190.15.129.146/handle/49000/14920>
- Callejo Ramos, A. (2019). Conservación de forrajes (XIV): uso de aditivos en el ensilado. *Frisona Española*, 233, 92–100. <https://oa.upm.es/56898/>
- Cao, X., Cai, R., Zuo, S., Niu, D., Yang, F., & Xu, C. (2024). Enhanced lignin degradation by *Irpex lacteus* through expanded sterilization further improved the fermentation quality and microbial community during the silage preservation process. *Bioresources and Bioprocessing*, 11(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40643-024-00730-2>
- Castillo Rangel, F., Villalobos Villalobos, G., Domínguez Díaz, D., & Ortega Gutiérrez, J. Á. (2017). Effect of the dietary level of cull pinto beans (*Phaseolus vulgaris*) on ruminal fermentation, kinetics, and digestibility of hair lambs. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46, 405–412. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902017000500006>
- Castillo-Castillo, Y., Arzola-Alvarez, C., Fonseca, M., Salinas-Chavira, J., Ontiveros-Magadan, M., Hume, M. E., Anderson, R. C., Flythe, M. D., Byrd, J. A., & Ruiz-Barrera, O. (2023). Effects of Hops Treatment on Nitrogen Retention, Volatile Fatty Acid Accumulations, and Select Microbial Populations of Composting Poultry Litter Intended for Use as a Ruminant Feedstuff. *Microorganisms*, 11(4), 839. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040839>
- Castillo-Castillo, Y., Solis, R., Quintana, A. A., Arzola, C., Olivas-Palacios, A. L., Salinas-Chavira, J., & Anderson, R. (2019). PSXI-17 Influence of hops on in vitro ruminal fermentation of corn grain. *Journal of Animal Science*, 97(Suppl 3), 408. [doi 10.1093/jas/skz258.809](https://doi.org/10.1093/jas/skz258.809)
- Čermák, P., Palečková, V., Houška, M., Strohalm, J., Novotná, P., Míkyška, A., Jurková, M., & Sikorová, M. (2015). Inhibitory effects of fresh hops on *Helicobacter pylori* strains. *Czech J. Food Sci.*, 33, 2015 (4): 302–307 [doi: 10.17221/261/2014-CJFS](https://doi.org/10.17221/261/2014-CJFS)
- Cordiviola, C. A., Arias, R., Muro, M. G., Boyezuk, D., Trigo, M. S., Reynaldi, F. J., & Hugo, A. A. (2020). Aislamiento de bacterias lácticas nativas a partir



de ganado caprino con fines de selección como potenciales inoculantes para silo. <http://hdl.handle.net/11336/244946>

- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.007>
- Díaz Monroy, B., Chacha, E., & Fernanda Baquero Tapia, M. (2018). Yellow carrot (*Daucus carota* L.), a biotechnological food for cows. https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_agricultura/article/view/8442/7126
- Doyle, C. J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2015). Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 197, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022>
- Driehuis, F. (2013). Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. *Agricultural and Food Science*, 22(1), 16–34. DOI: <https://doi.org/10.23986/afsci.6699>
- Driehuis, F., Wilkinson, J. M., Jiang, Y., Ogunade, I., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4093–4110. doi: [10.3168/jds.2017-13836](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13836)
- Emerstorfer, F., Hein, W., Resch, R., Poetsch, E. M., Zitz, U., & Kneifel, W. (2011). Application of plant-based antimicrobials for the growth inhibition of clostridia in pressed beet pulp silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(11), 2038–2044. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4416>
- FAO. (2023). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2023. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc7724es>
- Flythe, M. D., & Harlow, B. E. (2019). Effects of Hops (*Humulus lupulus* L.) Beta-Acids on Short Chain Fatty Acid Production from Complex Carbohydrates by Rumen Microbiota. *Advances in Microbiology*, 9(12), 983–992. DOI: [10.4236/aim.2019.912063](https://doi.org/10.4236/aim.2019.912063)
- Garay-Martínez, J. R., Lucio-Ruíz, F., Godina-Rodríguez, J. E., Joaquín-Cancino, S., Maldonado-Jáquez, J. A., & Granados-Rivera, L. D. (2024). Valor nutritivo de ensilados de soya y pasto buffel en diferentes proporciones. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 15(2), e3648–e3648. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v15i2.3648>
- García-González, R., López, S., Fernández, M., Bodas, R., & González, J. S. (2008). Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal



- methane production in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1–3), 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.008>
- García, D. C. (2016). Calidad fermentativa y nutricional del ensilaje de *Pennisetum purpureum* cv. Mott con diferentes proporciones de *Pueraria phaseoloides*. *Zootecnia Tropical*, 34(1), 47–57. <http://publicaciones.inia.gob.ve/index.php/zootecniatropical/article/view/109>
- González Mora, B., Sosa Cossio, D., Marrero Rodríguez, Y., García Hernández, Y., & Albelo Dorta, N. (2022). Selección de un medio de cultivo para el crecimiento de *Pichia guilliermondii* LEVICA-27 como aditivo activador de la fermentación ruminal. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 56(2). ISSN 2079-3480. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802022000200003&lng=es&tlng=pt
- González Moreno, E. (2015). Bromatología del ensilado de pasto mar alfalfa (*Pennisetum* sp.) fertilizado con ENTEC® e inoculado con sil-all 4x4®. (Ing.) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/6712>
<http://hdl.handle.net/11336/244946>
- Guan, Z.-B., Luo, Q., Wang, H.-R., Chen, Y., & Liao, X.-R. (2018). Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 3569–3592. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2883-z>
- Gülümser, E., Mut, H., Sucu, E., Başaran, U., & Çopur Doğrusöz, M. (2024). The impact of adding hops to alfalfa at different rates on silage quality and methane emissions in vitro. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 48(1), 71–80. DOI: [10.55730/1300-011X.3163](https://doi.org/10.55730/1300-011X.3163)
- Guo, X., Xu, D., Li, F., Bai, J., & Su, R. (2023). Current approaches on the roles of lactic acid bacteria in crop silage. *Microbial Biotechnology*, 16(1), 67–87. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14184>
- Henderson, N. (1993). Silage additives. *Animal Feed Science and Technology*, 45(1), 35–56. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(93\)90070-Z](https://doi.org/10.1016/0377-8401(93)90070-Z)
- Herrera, M. L.; WingChing-Jones, R.; and Rojas-Bourrillon, A. 2016. Bromatological composition of pineapple crown silage with citrus pulp, hay, and urea. *Agronomía Mesoamericana* 27:37-47. <https://doi.org/10.15517/am.v27i1.21876>
- Isidro-Requejo, L. M., Maldonado-Jáquez, J. A., Granados-Rivera, L. D., Salinas-González, H., Vélez-Monroy, L. I., Chávez Solís, A. U., & Pastor López, F. J. (2017). Suplementación pre y postparto durante la estación lluviosa en



- cabras locales del norte de México. *Nova Scientia*, 9(19), 134–153. <https://doi.org/10.21640/ns.v9i19.977>
- Jiang, H., Okoye, C. O., Wu, Y., Gao, L., Li, X., Wang, Y., & Jiang, J. (2024). Silage pathogens and biological control agents: effects, action mechanisms, challenges and prospects. *BioControl*, 1–17. [doi: 10.1007/s10526-023-10236-z](https://doi.org/10.1007/s10526-023-10236-z)
- Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., & Dostálek, P. (2016). Biologically active compounds from hops and prospects for their use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 542–567. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>
- Keskin, Ş., Şirin, Y., Çakir, H. E., & Keskin, M. (2019). An investigation of *Humulus lupulus* L.: Phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes. *South African Journal of Botany*, 120, 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.017>
- Klein, G., Rüben, C., & Upmann, M. (2013). Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Current Microbiology*, 67, 200–208. [doi: 10.1007/s00284-013-0354-1](https://doi.org/10.1007/s00284-013-0354-1)
- Kleinschmit, D. H., & Kung Jr, L. (2006). The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 3999–4004. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72443-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72443-2)
- Kung Jr, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Kung Jr, L., Stokes, M. R., & Lin, C. J. (2003). Silage additives. *Silage Science and Technology*, 42, 305–360. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c7>
- Lavrenčič, A., Levart, A., Košir, I. J., & Čerenak, A. (2015). In vitro gas production kinetics and short-chain fatty acid production from rumen incubation of diets supplemented with hop cones (*Humulus lupulus* L.). *Animal*, 9(4), 576–581. [doi: 10.1017/S1751731114002936](https://doi.org/10.1017/S1751731114002936)
- Liu, Q. H., Shao, T., & Zhang, J. G. (2013). Determination of aerobic deterioration of corn stalk silage caused by aerobic bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 183(3–4), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.05.012>
- López-Garrido, S. J., Peralta, M. A. C., Martínez, G. D. M., & Camacho-Escobar, M. A. (2014). The effect of commercial additive (toxic-chec) and propionic acid on the fermentation and aerobic stability of silage with pig excreta.



- American Journal of Experimental Agriculture*, 4(12), 1820.
<https://doi.org/10.9734/AJEA/2014/12035>
- Ma, T., Li, X., Zhong, Y., Luo, H., Du, Z., Xiao, Q., Liu, W., & Yan, Y. (2024). Study on the silage quality of mixed whole plant maize and different legume forage in the Northwest Plateau area of Sichuan Region. *Acta Agrestia Sinica*, 32(9), 2999. DOI: [10.11733/j.issn.1007-0435.2024.09.034](https://doi.org/10.11733/j.issn.1007-0435.2024.09.034)
- Macas Hidalgo, M. E. (2013). Evaluación de tres Tipos de Ensilaje Biológicamente Acelerado en el Levante de Ovinos Mejorados (Bachelor's thesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Pecuarias Escuela de Ingeniería Zootécnica
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2381>
- Magalhaesa, P. J., Carvalho, D. O., Cruzb, J. M., Guidoa, L. F., & Barros, A. A. (2010). Aspectos esenciales y beneficios para la salud del xantohumol, un producto natural derivado del lúpulo y la cerveza(Parte I). *Cerveza y Malta*, N°. 187, págs. 41-49, ISSN 0300-4481. <https://aetcm.es/wp-content/uploads/2021/05/041-051-Aspectos-188.pdf>
- Mari, L. J. (2008). Desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) fresca ou ensilada e o padrão de fermentação e a estabilidade aeróbia das silagens aditivadas. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Agronomía. Piracicaba, Brasil: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
<https://doi.org/10.11606/T.11.2008.tde-16072008-120405>
- McAllister, T. A., Dunière, L., Drouin, P., Xu, S., Wang, Y., Munns, K., & Zaheer, R. (2018). Silage review: using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4060–4074.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>
- Mohammadi, B., Heydari, M., Abdolkhani, D., & Cheshmeh, S. E. J. S. (2024). Producing Silage from Food and Agricultural Waste and Fodder Using Microorganisms: A Review. *Asian J. Res. Rev. Agric*, 6(1), 49–57.
<https://prh.globalpresshub.com/review-history/1539>
- Molina, A. M. G., Roa, L. B., Alzate, S. R., León, J. G. S. D., & Arango, A. F. B. (2004). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista Lasallista de Investigación*, 1(1), 66–71.
- Monroy, B. L. D., Iglesias, A. E., & Valiño, E. (2014). Consorcios microbianos con actividad ácido-láctica promisorios aislados desde inoculantes bacterianos nativos para ensilajes. *Revista Ciencia y Agricultura*, 11(1), 17–25.
<https://link.gale.com/apps/doc/A417187184/AONE?u=anon~e30577b8&sid=googleScholar&xid=58251a30>
- Moore-Colyer, M., Westacott, A., Rousson, L., Harris, P., & Daniels, S. (2023). Where Are We Now? Feeds, Feeding Systems and Current Knowledge of



- UK Horse Owners When Feeding Haylage to Their Horses. *Animals*, 13(8), 1280. <https://doi.org/10.3390/ani13081280>
- Mora Espinoza, F. J. (2015). Caracterización microbianas y fermentativas del ensilaje de híbridos de maíz (*Zea mays*) bajo dos edades de corte y sesenta días de fermentación (Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ).
- Morales, S. M. B., Castelblanco, E. M. S., & Suárez, H. J. G. (2014). Aislamiento de microorganismos amilolíticos, celulolíticos y lignolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá. *Revista Sennova: Revista Del Sistema de Ciencia, Tecnología e Innovación*, 1(1), 148–155. <http://revistas.sena.edu.co/index.php/sennova/article/view/89/101>
- Morales-Querol, D., Rodríguez-Hernández, R., López-Vigo, O., Ojeda-García, F., Camejo-Rodríguez, D., García-Sánchez, F., & Fundora-Fernández, L. (2022). Evaluación química y organoléptica de ensilajes de *Sorghum bicolor* (L.) Moench y pulpa de *Citrus sp.* *Pastos y Forrajes*, 45. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung Jr, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
- Natarajan, P., Katta, S., Andrei, I., Ambati, V. B. R., Leonida, M., & Haas, G. J. (2008). Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. *Phytomedicine*, 15(3), 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.10.008>
- Nsereko, V. L., Smiley, B. K., Rutherford, W. M., Spielbauer, A., Forrester, K. J., Hettinger, G. H., Harman, E. K., & Harman, B. R. (2008). Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.039>
- Núñez Hernández, G., Payán García, J. A., Pena Ramos, A., González Castañeda, F., Ruiz Barrera, O., & Arzola Alvarez, C. (2010). Caracterización agronómica y nutricional del forraje de variedades de especies anuales en la región norte de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(2), 85–98. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.3782>
- Ohsugi, M., Basnet, P., Kadota, S., & Isl, E. (1997). Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. *Journal of Traditional Medicines*, 14, 186–191. ISSN: 1340-6302. <https://toyama.repo.nii.ac.jp/record/5323/files/19970304.pdf>



- Okoye, C. O., Wang, Y., Gao, L., Wu, Y., Li, X., Sun, J., & Jiang, J. (2023). The performance of lactic acid bacteria in silage production: A review of modern biotechnology for silage improvement. *Microbiological Research*, 266, 127212. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127212>
- Ontiveros-Magadan, M., Anderson, R. C., Ruiz-Barrera, O., Arzola-Alvarez, C., Salinas-Chavira, J., Hume, M. E., Scholljegerdes, E. J., Harvey, R. B., Nisbet, D. J., & Castillo-Castillo, Y. (2021). Evaluation of antimicrobial compounds to inhibit growth of select Gram-positive pathogenic or antimicrobial resistant bacteria in air-exposed silage. *Canadian Journal of Animal Science*, 102(1), 75–84. <https://doi.org/10.1139/cjas-2021-0061>
- Oude Elferink, S. J. W. H., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., & Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 125–132. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105. <https://doaj.org/article/4d485f60a0aa45a4829bd82ae082aa10>
- Parvin, S., & Nishino, N. (2009). Bacterial community associated with ensilage process of wilted guinea grass. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 2029–2036. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04391.x>
- Pedroso, A. de F., Nussio, L. G., Loures, D. R. S., Paziani, S. de F., Ribeiro, J. L., Mari, L. J., Zopollatto, M., Schmidt, P., Mattos, W. R. S., & Horii, J. (2008). Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. *Scientia Agricola*, 65, 589–594. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000600004>
- Pérez, C. E. C. (2011). Uso de aditivos para ensilajes en la zona sur de Chile (Tesis al título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Austral de Chile). <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fac266u/doc/fac266u.pdf>
- Persson, T., & Bakken, A. K. (2024). A review of the effects of density and silo type on silage fermentation, nutritive quality and losses during storage. *NIBIO Rapport*. <https://hdl.handle.net/11250/3127656>
- Pollach, G., Hein, W., & Beddie, D. (2002). Application of hop beta-acids and rosin acids in the sugar industry. *Zuckerindustrie-Berlin*-, 127(12), 921–930.
- Queiroz, O. C. M., Ogunade, I. M., Weinberg, Z., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4132–4142. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13901>



- Ramírez-Ramírez, J., Loya-Olguín, J., Ulloa, J., Rosas-Ulloa, P., Gutiérrez-Leyva, R., & Silva-Carrillo, Y. (2021). Use of fish waste and pineapple peel to produce biological silage. *Abanico Veterinario*, 10(1), 1–12. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2020.29>
- Reyes-Cruz, L. A., Zaldívar-Cruz, J. M., Ramos-Juárez, J. A., López-López, R., & Bucio-Galindo, A. (2019). Elaboración de un Alimento Energético-Proteico a Base de Malanga Utilizando Levaduras *Saccharomyces cerevisiae* para Alimentación Bovina. Tecnológico Nacional de México. ISBN: 978-607-96575-8-1
- Rodríguez, R., Sosa, A., & Rodríguez, Y. (2007). La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(4), 303–311. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017712001>
- Rubio Fernández, C. N. (2024). Pastos y forrajes como fuente de alimento para animales en épocas de sequía. Universidad Técnica de Babahoyo. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/16194>
- Salfer, I. J., Fessenden, S. W., & Stern, M. D. (2020). Evaluation of iso- α -acid and β -acid extracts from hops (*Humulus lupulus* L.) on fermentation by rumen microbes in dual-flow continuous culture fermenters. *Animal Feed Science and Technology*, 260, 114385. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114385>
- Sánchez-Guerra, N. A., Gonzalez-Ronquillo, M., Anderson, R. C., Hume, M. E., Ruiz-Albarrán, M., Bautista-Martínez, Y., Zúñiga-Serrano, A., Nájera-Pedraza, O. G., & Salinas-Chavira, J. (2024). Improvements in fermentation and nutritive quality of elephant grass [*Cenchrus purpureus* (Schumach.) Morrone] silages: a review. *Tropical Animal Health and Production*, 56(5), 1–16. doi: [10.1007/s11250-024-04027-6](https://doi.org/10.1007/s11250-024-04027-6)
- Santos da Silva, W., Carvalho dos Santos, T. M., Cavalcanti Neto, C. C., Espíndola Filho, A. M., Mesquita da Silva, S. G., Neves Figueiredo, A., & Araújo de Melo, B. (2014). Características y estabilidad aeróbica de ensilajes de caña de azúcar, tratada con urea, NaOH y maíz. *Pastos y Forrajes*, 37(2), 182–190. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=269131791008>
- Siefers, M. K. (2000). History of silage, sorghum silage production, and nutritive value of pelleted poultry by-products and restaurant waste. Kansas State University.
- Siqueira, G. R., Reis, R. A., Schocken-Iturrino, R. P., Pires, A. J. V., Bernardes, T. F., & Amaral, R. C. do. (2007). Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. *Revista Brasileira de*



Zootecnia, 36, 2000–2009. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007000900008>

- Siqueira, G. R., Reis, R. A., Schocken-Iturrino, R. P., Pires, A. J. V., Bernardes, T. F., & Roth, M. de T. P. (2010). Queima e aditivos químicos e bacterianos na ensilagem de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 103–112. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000100014>
- Siragusa, G. R.; Haas, G. J.; Matthews, P. D.; Smith, R. J.; Buhr, R. J.; Dale, N. M.; and Wise, M. G. 2008. Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract jejunum and caecum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61:853–858. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn024>
- Souza, W. F. de, Costa, K. A. de P., Guarnieri, A., Severiano, E. da C., Silva, J. T. da, Teixeira, D. A. A., Oliveira, S. S., & Dias, M. B. de C. (2019). Production and quality of the silage of corn intercropped with Paiaguas palisadegrass in different forage systems and maturity stages. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 48, e20180222. <https://doi.org/10.1590/rbz4820180222>
- Spoelstra, S. F., Courtin, M. G., & Van Beers, J. A. C. (1988). Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. *The Journal of Agricultural Science*, 111(1), 127–132. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859600082915>
- Staerfl, S. M., Kreuzer, M., & Soliva, C. R. (2010). In vitro screening of unconventional feeds and various natural supplements for their ruminal methane mitigation potential when included in a maize-silage based diet. *Journal of Animal and Feed Sciences* 19:651-664. <https://doi.org/10.22358/jafs/66338/2010>
- Valencia Ramírez, A. F. (2016). Los ensilajes una mirada a esta estrategia de conservación de forraje para la alimentación animal en el contexto colombiano. <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/261>
- Van Soest, P. J. van, Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. doi: [10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Villacrés, R. S. (2017). 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. Trabajo de Investigación. Ambato–Tungurahua: Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agropecuarias. <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/26308>



- Vázquez-Meraz, V., Enríquez-Quiroz, J. F., Mendoza-Pedroza, S. I., & González-Trinidad, A. (2024). Ensilado de forraje de corte para pequeños productores. *Agro-Divulgación*, 4(4). <https://doi.org/10.54767/ad.v4i4.357>
- Wagner, B., Asencio, V., & Caridad, J. (2013). Como preparar un buen ensilaje. Serie: Conservación de Forrajes. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF). Santo Domingo, República Dominicana.
- Weinberg, Z., & Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(1), 53–68. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00253.x>
- Wróbel, B., Nowak, J., Fabiszewska, A., Paszkiewicz-Jasińska, A., & Przystupa, W. (2023). Dry matter losses in silages resulting from epiphytic microbiota activity—A comprehensive study. *Agronomy*, 13(2), 450. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020450>
- Yıldız, S. (2024). Silage Quality, Nutrient Content and Relative Feed Value of Urea and Molasses Added Sweet Maize [*Zea mays* (L.) *saccharata* Sturt. Silage. *Indian Journal of Animal Research*, 58(9). DOI: [10.18805/IJAR.BF-1671](https://doi.org/10.18805/IJAR.BF-1671)
- Zielińska, K. J., & Fabiszewska, A. U. (2018). Improvement of the quality of maize grain silage by a synergistic action of selected lactobacilli strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2400-9>