


## Efecto de la fecha de corte y del uso de aditivos en la composición química y calidad fermentativa de ensilado de girasol



Aurora Sainz-Ramírez <sup>a</sup>

Adrián Botana <sup>b</sup>

Sonia Pereira-Crespo <sup>c</sup>

Laura González-González <sup>b</sup>

Marcos Veiga <sup>b</sup>

César Resch <sup>b</sup>

Juan Valladares <sup>b</sup>

Carlos Manuel Arriaga-Jordán <sup>a\*</sup>

Gonzalo Flores-Calvete <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR). Toluca, México.

<sup>b</sup> Instituto Galego de Calidade Alimentaria, Centro de Investigacións Agrarias de Mabegondo (INGACAL-CIAM) Apartado 10, 15080 A Coruña, España.

<sup>c</sup> Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite (LIGAL) A Coruña, España.

\* Autor de correspondencia: [cmarriagaj@uaemex.mx](mailto:cmarriagaj@uaemex.mx)

### Resumen:

El objetivo fue evaluar fechas de corte y del uso de aditivos sobre la calidad del ensilado de la planta entera de girasol. La variedad forrajera (Rumbosol-91) se cosechó en las semanas 1, 3 y 5 post-floración (F1, F2 y F3, respectivamente) y tratada con los siguientes aditivos:

1)  $1.5 \times 10^5$  ufc de inoculante  $\text{g}^{-1}$  de forraje, a base de bacterias lácticas homofermentativas *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus plantarum* (INOC), 2) 3 ml  $\text{kg}^{-1}$  de forraje de una solución al 85% de ácido fórmico (FORM) y 3) sin aditivo (Testigo); siguiendo un diseño factorial 3x3 con cinco repeticiones. La producción de efluente y las pérdidas totales de materia seca (MS) se redujeron, desde 282 y 134  $\text{g kg}^{-1}$  en F+1 hasta 96 y 87  $\text{g kg}^{-1}$  en F+5 como resultado del alto contenido de humedad del forraje próxima a la floración. El análisis NIRS de las muestras de ensilaje mostró que los contenidos de proteína, fibra y digestibilidad descendían significativamente con la madurez de la planta; la rápida acumulación de aceite en la MS hizo que la concentración energética fuese superior en el estado fenológico más avanzado. La calidad fermentativa de los ensilajes fue satisfactoria, independientemente del momento de corte y del uso de aditivo. Se concluye que es preferible el corte de la planta a las cinco semanas post-floración, donde se espera una fermentación aceptable sin necesidad de conservantes.

**Palabras clave:** Girasol, Madurez, Digestibilidad *in vitro*, Conservantes.

Recibido: 02/10/2018

Aceptado: 19/07/2019

## Introducción

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una planta anual, con numerosos genotipos o subespecies cultivadas como plantas ornamentales, oleaginosas y forrajeras. Los datos oficiales acerca de la superficie de girasol cultivado en México<sup>(1)</sup> indican que ascendió a aproximadamente 2,000 ha en 2016, muy por debajo de su potencial, estando orientadas a la producción de aceite, principalmente en zonas irrigadas<sup>(2)</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que el cultivo de girasol como forraje ensilado es una opción viable en la alimentación de rumiantes, dadas sus características de rápido desarrollo, tolerancia a bajas temperaturas y poca exigencia a humedad y fertilización, por lo que, se considera como una buena alternativa para las zonas de temporal, siendo una alternativa al cultivo del maíz en la alimentación animal<sup>(3)</sup>.

El uso del girasol como verde o de verano ensilado, fue popular en los Estados Unidos de América a comienzos del siglo XX, pero en la actualidad es menor en comparación con el maíz<sup>(4)</sup>. Su establecimiento puede ser en monocultivo o combinado con el maíz<sup>(5)</sup> y es usado como ensilado en siembras cuando su establecimiento fue tardío o afectado por daños climáticos<sup>(6)</sup>.

Su aprovechamiento como ensilado, es sujeto a controversia, dado que no se ha determinado el momento óptimo de aprovechamiento. Por una parte, algunos estudios, presentan como punto de cosecha alrededor de la floración, en función de valores máximos de digestibilidad y proteína<sup>(7)</sup>, y por otra parte, otros autores recomiendan estados más avanzados, cuando las semillas estén bien formadas<sup>(8)</sup> o incluso cerca de la madurez fisiológica de la planta<sup>(9)</sup> para evitar una alta producción de efluente y reducción de pérdidas en el ensilaje

El bajo contenido de materia seca del girasol, un moderado contenido en carbohidratos y una relativamente alta capacidad tampón, a lo largo de su ciclo; son factores que pueden comprometer la calidad de fermentación y su conservación en el silo<sup>(10,11)</sup>, a pesar de esto, distintos autores han demostrado la posibilidad de obtener ensilados bien conservados<sup>(12)</sup>. El desarrollo en el uso de aditivos para controlar la fermentación y reducción de pérdidas en el proceso de ensilaje fue uno de avances tecnológicos más relevantes del siglo pasado, y actualmente los inoculantes, a base de bacterias lácticas, son los aditivos más utilizados en Europa y América<sup>(13)</sup>. Estos se añaden al forraje con el objetivo de controlar la población de bacterias que causan pérdidas del ensilado por una ineficiente fermentación de los azúcares<sup>(14)</sup>. Además de lo anterior, también hay evidencias de la utilidad de los inoculantes en forrajes con alto contenido en humedad, no obstante, los resultados son inconsistentes<sup>(15)</sup>.

Ante esta situación, la acidificación directa del forraje con ácidos orgánicos, podría ser una alternativa. Existe numerosa bibliografía acerca de la efectividad del ácido fórmico sobre la mejora de la calidad de fermentación en la producción animal cuando se usa forraje con alta humedad<sup>(15-18)</sup>. Aplicado en forma de solución comercial al 85 % y dosis entre 2 a 5 L t<sup>-1</sup> de forraje fresco, reduce el pH de forma inmediata, favorece la acción de las bacterias lácticas frente a las enterobacterias y clostridios y restringe la intensidad de la fermentación, con lo cual, se minimiza el riesgo de la presencia de metabolitos indeseables en el ensilado que limitan su composición química<sup>(17)</sup>. Frente a estas ventajas, la utilización de fórmico en forrajes con alta humedad puede, en ciertas ocasiones, incrementar la producción de efluente y el nivel de pérdidas totales respecto del control sin aditivo<sup>(15)</sup>. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo el objetivo de evaluar el efecto de la fecha de corte y del uso de aditivos sobre el nivel de pérdidas, producción de efluente, composición química y calidad fermentativa del ensilaje de girasol.

## Material y métodos

El estudio se realizó durante el periodo de verano-otoño de 2016, en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), situada en la zona costera atlántica noroccidental de Galicia (España), 43° 14' 18.45'' N y 8° 15' 59.60'' O, a 100 msnm, en

condiciones de secanos húmedos. Se evaluaron tres fechas de corte y tres aditivos siguiendo un diseño factorial con cinco repeticiones. La duración total del ensayo entre la siembra y la última fecha de cosecha fue de 108 días. Durante el cultivo la temperatura media fue de 18.2 °C y la precipitación acumulada 137 mm, algo inferior a lo habitual para el lugar. El inicio de la floración tuvo lugar a los 72 días tras la siembra, correspondiendo según la escala de Schneiter y Miller<sup>(18)</sup> al estado final de R4 (apertura de los botones florales comenzando a ser visibles las flores liguladas amarillas). Se utilizó la variedad forrajera Rumbosol-91, sembrada a finales de junio de 2016, que se cosechó en las semanas 1, 3 y 5 después de la floración (tratamientos F+1, F+3 y F+5, respectivamente). En cada fecha de corte se recolectaron aproximadamente 50 kg de forraje picado a 2-3 cm, homogeneizado y dividido en tres submuestras y se les asignó los aditivos: i) un inoculante (INOC) a base de bacterias lácticas homofermentativas *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus plantarum* (SILOSOLVE F100, 3F Technology) a dosis recomendada por el fabricante (1.5 x 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup> de forraje), ii) una solución de ácido fórmico al 85% (FORM) a dosis de 3 mL kg<sup>-1</sup> de forraje y iii) un testigo sin aditivo (TESTIGO). Para cada combinación (fecha de corte y aditivo) se elaboraron cinco silos de laboratorio en bolsas de polietileno (40x10cm), dentro de un tubo de PVC de 2.2 L de capacidad útil dotado con un sistema de drenaje de efluente<sup>(19,20)</sup>.

### Análisis químico

Se determinó el peso neto del forraje de cada silo en el momento de su confección e inmediatamente antes de su apertura a los 60 días, así como el peso del efluente producido utilizando una balanza de precisión 0.1 g (AND, modelo HR-202). De cada muestra tomada al momento del llenado de cada silo, se determinó el contenido en materia seca (MS) secándolas en una estufa de aire forzado a 80 °C durante 16 h. Utilizando un espectrofotómetro monocromador Foss NIRSystem 6500 (Foss NIRSystem Silver Spring, Washington, USA), se obtuvieron los espectros de las muestras secas y molidas a 1 mm y se estimó su composición en materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), fibra ácido detergente (FAD), fibra neutro detergente (FND), carbohidratos solubles en agua (CSA), digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DMOIV) y extracto etéreo (EE) utilizando para ello las calibraciones desarrolladas en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM)<sup>(19)</sup>. La capacidad tampón (CTNaOH) se determinó por métodos de referencia<sup>(21)</sup>, siendo expresada como meq de NaOH kg<sup>-1</sup> MS. El coeficiente de fermentabilidad del forraje se estimó<sup>(22)</sup> según la ecuación  $CF = (MS + 80 \times CSA) / (CTNaOH \times 0.127 - 0.3)$ , donde MS representa el % de contenido de MS, CSA representa la concentración de CHO solubles en agua expresados como % de la MS y CTNaOH es la capacidad tampón expresada en miliequivalentes de álcali por 100 g de MS. Valores de CF superiores a 45 indican facilidad

para ensilar, mientras que valores inferiores a 35 son indicativos de una alta probabilidad de mala fermentación.

### Análisis fermentativo

Los silos se abrieron a los 60 días. En muestra fresca de ensilado se determinó el contenido en MS que fue posteriormente corregido por pérdida de volátiles para los productos de fermentación durante el secado<sup>(23)</sup>. Utilizando calibraciones NIRS desarrolladas en el CIAM, se determinaron los valores de MO, PB, FAD, FND, DMOIV y EE de las muestras secas y molidas a 1 mm. La concentración en energía neta leche (ENL) del ensilado se calculó<sup>(24)</sup> según la expresión  $ENL \text{ (Mcal kg}^{-1} \text{ MS)} = (178 \times DMOIV \times MO + 0.008 \times DMOIV^2 \times MO^2) \times 10^{-6}$ , donde DMOIV se expresa en % y MO en %MS. A este valor se le adicionó la energía neta correspondiente al aceite de las muestras considerando un valor medio de 4.9 Mcal de ENL kg<sup>-1</sup> de aceite<sup>(25)</sup> para los valores de EE en exceso de 4 %MS, ya que, la obtención de las calibraciones NIRS para estimación de la digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal<sup>(20)</sup> se realizó con muestras desengrasadas cuando se superaba dicho valor de EE, a fin de evitar el efecto depresor del aceite de las muestras sobre la actividad de los microorganismos ruminales<sup>(26)</sup>. Una segunda alícuota de ensilado se congeló a -18°C hasta su análisis fermentativo, determinándose el pH mediante un pHmetro provisto de electrodo combinado, el nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) con un electrodo selectivo (Orion) y el nitrógeno soluble (N-Soluble) mediante digestión macro Kjeldahl. Los ácidos de fermentación (láctico, acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, isobutírico e isovalérico) y los alcoholes (etanol, butanol, propanol) se determinaron por cromatografía de gases<sup>(27)</sup>. El valor de ácidos grasos volátiles totales (AGV) se calculó como la suma, expresada en mmoles kg<sup>-1</sup> MS de las concentraciones de los ácidos de fermentación, con exclusión del láctico.

Los valores de pérdidas totales, producción de efluente, parámetros de composición química y de calidad fermentativa se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute 2009 v. 9.2) según el modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i F + \beta_j A + (\alpha\beta)_{ij} FxA + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde la fecha de corte (F, i=3) y el aditivo (A, j=3) se consideraron factores fijos y la repetición (R, k=5) un factor aleatorio y FxA representan la interacción. La separación de medias de las variables cuando el test F en el ANOVA era significativo se realizó mediante el test HSD de Duncan ( $\alpha=0.05$ ).

## Resultados y discusión

### Desarrollo del cultivo y producción de materia seca

En la primera fecha de corte (F+1) el estado era R5.5 (50% de las flores tubuladas en anthesis o post-anthesis), alcanzando en F+3 el estado R6 (floración completa, con las semillas formadas y las flores liguladas marchitas) y en F+5 el estado R7 (parte inferior del capítulo de color amarillo-pálido, con las semillas engrosadas, en estado lechoso-pastoso). El rendimiento en estas tres fechas fue estimado<sup>(28)</sup>, en 9.1, 10.1 y 11.5 t MS ha<sup>-1</sup> respectivamente. La mayor producción unitaria obtenida en la fecha de corte más tardía coincide con lo observado con otros trabajos realizados en el CIAM con la misma variedad forrajera<sup>(29)</sup>, así como en informes previos con diversos genotipos<sup>(8,30)</sup>, en los cuales señalan como estado más adecuado para ensilar el momento en que las plantas presenten capítulos con coloración verde-amarillenta en la base y las semillas estén bien formadas.

La composición química, capacidad tampón, coeficiente de fermentabilidad y estimación de energía neta para lactación del girasol en estado fresco, se presentan en el Cuadro 1. El momento de corte afectó significativamente ( $P < 0.001$ ) al contenido en MS, composición química (a excepción del contenido en FAD), así como a los valores de digestibilidad *in vitro* y de energía neta leche del girasol al momento de ensilar. La MS del cultivo promedió 16 % en todos los cortes y aumentó con la edad de la planta desde un valor de 12.1 % en F+1 hasta el 18.6 % en F+5, a razón de 1.53 unidades porcentuales por semana. El contenido en MO mostró una tendencia cuadrática con un valor en F+3 (95.5 %MS) superior al de las otras dos fechas de corte (90.9 y 90.5 %MS). La madurez del girasol disminuyó los contenidos de proteína, pared celular, azúcares y digestibilidad, con valores de 9.4, 9.2 y 8.6 para PB, 41.8, 40.5 y 36.8 para FND, 16.9, 15.3 y 10.6 para CSA y 67.0, 65.7 y 58.4 para DMOIV en F+1, F+3 y F+5, respectivamente, contrastando con los valores de MS. Mientras que la concentración de EE aumentó de 2.7 a 17.6 % con el avance de la madurez como consecuencia de la conversión de carbohidratos no estructurales en aceite en las semillas, lo cual se hizo notar especialmente en la última fecha del ensilado. De la misma forma se comportó la concentración energética, la cual aumentó de ENL de 1.38, 1.57 y 1.83 Mcal kg<sup>-1</sup> MS en las fechas F+1, F+3 y F+5 respectivamente. La capacidad tampón y el coeficiente de fermentabilidad no se vieron afectados ( $P \geq 0.05$ ) por la fecha de corte, oscilando los valores de CTNaOH entre 320 y 346 meq NaOH kg<sup>-1</sup> MS y de CF entre 45.7 y 38.6, aunque en este último cabe indicar una tendencia ( $P = 0.10$ ) que indica una mayor ensilabilidad de la planta en etapas más tempranas de desarrollo, debido al mayor contenido en azúcares, comparada con fechas más tardías.

**Cuadro 1:** Efecto de la fecha de corte sobre el contenido en MS, capacidad tampón, coeficiente de fermentabilidad y composición nutricional del girasol fresco

	Fecha de corte			EEM	P
	F+1	F+3	F+5		
Materia seca (MS), %	12.1 <sup>c</sup>	14.1 <sup>b</sup>	18.6 <sup>a</sup>	0.098	***
CT (meq NaOH kg <sup>-1</sup> MS)	320	346	335	6.94	NS
Coeficiente de fermentabilidad	45.7	42.5	38.6	2.02	NS
Composición química (%MS):					
MO	90.90 <sup>b</sup>	95.50 <sup>a</sup>	90.50 <sup>b</sup>	0.35	***
PB	9.40 <sup>a</sup>	9.20 <sup>a</sup>	8.60 <sup>b</sup>	0.12	***
FND	41.80 <sup>a</sup>	40.50 <sup>b</sup>	36.80 <sup>c</sup>	0.23	***
FAD	34.10	33.40	33.80	0.26	NS
EE	2.70 <sup>c</sup>	6.90 <sup>b</sup>	17.60 <sup>a</sup>	0.18	***
CSA	16.90 <sup>a</sup>	15.30 <sup>b</sup>	10.60 <sup>c</sup>	0.31	***
IVDMO, %	67.00 <sup>a</sup>	65.70 <sup>b</sup>	58.40 <sup>c</sup>	0.43	***
ENL, Mcal/kg MS	1.38 <sup>c</sup>	1.57 <sup>b</sup>	1.83 <sup>a</sup>	0.018	***

EEM= error estándar de la media; CT= capacidad tampón; MO= materia orgánica; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutra; FDA= fibra detergente ácida; EE= extracto etéreo; CSA= carbohidratos solubles en agua; IVDMO= digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica.

(\*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ; NS= no significativo  $P > 0.05$ ).

Diversos estudios realizados en Brasil y Argentina con la variedad forrajera Rumbosol-91 muestran la variación de composición química con la madurez de la planta. En el primer país, en una cosecha realizada entre las 4 y las 7 semanas tras la floración, se obtuvieron valores de PB entre 9.9 y 7.0 base seca<sup>(31)</sup>, mientras que, en otro trabajo con cortes entre los 97 y 112 días después de la siembra (Estados R7 a R9) se obtuvieron valores de PB entre 10.0 y 9.3 y de EE de 9.9 a 14.3 base seca, respectivamente<sup>(32)</sup>. En otro estudio, con fecha de corte de 97 DDS, se obtuvo un amplio rango de variación en los contenidos en PB (de 9.4 a 14.5 %MS) y en FND (de 40.6 a 48.7 %MS)<sup>(33)</sup>. Para la misma variedad Rumbosol-91, sembrada en primavera y cosechada en los estados R7 e R9 se obtuvieron valores de 9.6 y 8.3 %MS para PB, de 37.9 y 40.1 %MS para FND y de 15.1 y 13.4 %MS para EE<sup>(34)</sup>.

Dos trabajos realizados en la finca experimental del CIAM, en variedad Rumbosol-91, en diferentes años y fechas de cortes<sup>(29,30)</sup>, permitieron comparar los cortes de las semanas 2ª a la 6ª tras la floración siendo observado que en este intervalo se incrementaban los contenidos del forraje fresco en MS (de 15.6 a 22.4 %), en MO (de 89.9 a 85.8 %MS), en EE (de 2.3 a 17.0 %MS) y en ENL (de 1.34 a 1.61 Mcal kg<sup>-1</sup> MS), descendiendo los de carbohidratos solubles (de 22.4 a 8.4 %MS) y la digestibilidad (de 66.4 a 52.7 %MS). Estudios realizados en Francia a comienzos del último tercio del siglo pasado<sup>(32)</sup>, indican valores de digestibilidad del 70 a 75 % al inicio de la floración y del 60 al 75 % para la planta en estado de grano



pastoso. Sin embargo, trabajos más recientes de autores italianos realizados en secanos del valle del Po<sup>(35)</sup>, reportan valores de DMOIV cercanos al 60 % para la planta en plena floración, más acordes con los resultados obtenidos en este trabajo.

De acuerdo con, los coeficientes estimados en F1, F2 y F3, la ensilabilidad de los tres estados de desarrollo del girasol puede calificarse de buena a media. A pesar de que trabajos realizados en Alemania<sup>(10)</sup> asignan bajos valores para esta especie, una amplia revisión efectuada por otros autores<sup>(36)</sup> señala que el girasol en estado fresco presenta habitualmente un contenido en azúcares y una capacidad tampón que pueden ser considerados como medios, en el entorno de 120 -200 g kg<sup>-1</sup> MS y 350-550 meq NaOH kg<sup>-1</sup> MS, al mismo nivel que el raigrás italiano o los guisantes forrajeros, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Las pérdidas de materia seca, producción de efluente y composición nutricional de los ensilados, se presentan en el Cuadro 2. La fecha de corte ejerció un fuerte efecto significativo ( $P<0.001$ ) sobre la producción de efluente, la cual fue muy elevada sobre todo en los dos primeros cortes (28.2 % del peso fresco inicialmente ensilado en F+1 y 17.4 % en F+3) como consecuencia del alto contenido en humedad del forraje, descendiendo posteriormente al 9.6 % en el último aprovechamiento. En consecuencia, las pérdidas totales de MS en los dos primeros cortes (13.4 % en el primero y 12.5 % en el segundo) fueron significativamente superiores ( $P<0.001$ ) a las de la última fecha (8.7 %). Estudios que evaluaron el efecto del contenido en MS de la cosecha sobre las pérdidas del ensilado indican que con contenidos de MS del 30 % y superiores, las pérdidas por respiración y fermentación no deberían superar el 5 al 8 % de la MS ensilada, mientras que, en caso de cultivos cosechados con alta humedad (MS <25 %) las pérdidas suelen ser más elevadas debido a una mayor intensidad de la fermentación y, sobre todo, por las pérdidas causadas por el efluente<sup>(13,37)</sup>.



**Cuadro 2:** Efecto de la fecha de corte y del uso de aditivo sobre la producción de efluente, nivel de pérdidas totales y composición nutricional del ensilaje de girasol

	Efectos principales				Interacción					
	Corte				Aditivo				EEM	P
	F+1	F+3	F+5	P	TES	INOC	FORM	P		
n	15	15	15		15	15	15			
Pérdidas de materia seca (%MS)										
PMS	13.4 <sup>a</sup>	12.5 <sup>a</sup>	8.7 <sup>b</sup>	*	8.8 <sup>b</sup>	10.9 <sup>b</sup>	14.8 <sup>a</sup>	**	1.14	NS
Efluente (% materia fresca inicial)										
EFL	28.2 <sup>a</sup>	17.4 <sup>b</sup>	9.6 <sup>c</sup>	***	16.8 <sup>b</sup>	17.50 <sup>b</sup>	20.9 <sup>a</sup>	***	0.666	**
Materia seca (%)										
MS	14.8 <sup>b</sup>	15.3 <sup>b</sup>	19.0 <sup>a</sup>	***	16.3	16.3	16.5	NS	0.227	NS
Composición química (%MS)										
MO	89.3 <sup>b</sup>	90.3 <sup>a</sup>	89.0 <sup>b</sup>	***	90.1 <sup>a</sup>	90.1 <sup>a</sup>	88.5 <sup>b</sup>	***	0.154	NS
PB	11.4 <sup>a</sup>	11.3 <sup>a</sup>	9.3 <sup>b</sup>	***	10.7	10.7	10.6	NS	0.057	***
FND	45.5 <sup>a</sup>	43.9 <sup>b</sup>	38.9 <sup>c</sup>	***	42.1 <sup>b</sup>	42.6 <sup>b</sup>	43.5 <sup>a</sup>	**	0.259	**
FAD	37.5 <sup>a</sup>	35.7 <sup>b</sup>	32.3 <sup>c</sup>	***	34.3 <sup>b</sup>	34.8 <sup>b</sup>	36.4 <sup>a</sup>	***	0.161	***
EE	2.7 <sup>c</sup>	7.8 <sup>b</sup>	18.0 <sup>a</sup>	***	9.1 <sup>b</sup>	9.7 <sup>a</sup>	9.7 <sup>a</sup>	***	0.094	***
Digestibilidad <i>in vitro</i>										
IVDMO (%)	53.6 <sup>a</sup>	53.3 <sup>a</sup>	46.4 <sup>b</sup>	***	49.5 <sup>b</sup>	49.6 <sup>b</sup>	54.2 <sup>a</sup>	***	0.414	***
Energía neta leche (Mcal kg <sup>-1</sup> MS)										
ENL	1.04 <sup>c</sup>	1.23 <sup>b</sup>	1.56 <sup>a</sup>	***	1.23 <sup>c</sup>	1.25 <sup>b</sup>	1.34 <sup>a</sup>	***	0.009	**

n= número de observaciones; EEM= error estándar de la media; MO= materia orgánica; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutra; FDA= fibra detergente ácida; EE= extracto etéreo; IVDMO= digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica.

(\*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ; NS: no significativo  $P > 0.05$ ).

<sup>abc</sup> Valores afectados por distinto superíndice en la misma línea de cada efecto principal son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Comparando los valores medios del girasol en estado fresco y del ensilado resultante se destaca un aumento del contenido en MS (+1.4 %) y de la concentración (en %MS) de PB (+1.6 ud), FAD (+3.0 ud), FND (+1.4 ud) y EE (+0.4 ud) unido a un fuerte descenso en el valor de IVDMO (-12.6 %) y de ENL (-0.31 Mcal kg<sup>-1</sup>MS), lo cual se atribuye a la elevada producción de efluente en todos los cortes.

Como indican diversos estudios, es de esperar un incremento en la MS del ensilaje cuando el contenido en MS del forraje verde puesto en el silo es inferior al 23-25 %<sup>(38)</sup>, así como escasas variaciones en el contenido de cenizas y nitrógeno total cuando los correspondientes valores del ensilaje resultante se expresan sobre la base de la materia seca corregida por las pérdidas de volátiles que tienen lugar durante el proceso de secado en estufa<sup>(22)</sup>, mientras que, el contenido en fibra suele verse afectado significativamente por el ensilado, debido al

incremento pasivo provocado por pérdidas de materia seca no celulósica en el efluente o como gas durante la fermentación<sup>(39)</sup>. Por otra parte, aunque en general se asume que la digestibilidad del ensilado es igual o ligeramente inferior a la del forraje original<sup>(40)</sup>, existen evidencias de una importante disminución de la digestibilidad en el caso de forrajes ensilados con bajo contenido en materia seca, en razón a que el efluente contiene nutrientes altamente digestibles<sup>(41)</sup>, habiéndose señalado para ensilados con contenidos en materia seca próximos al 16 % un descenso medio de 7.0 unidades porcentuales en los valores de digestibilidad de la MS<sup>(42)</sup>, valor que fue superado ampliamente en nuestro estudio, debido probablemente a un mayor contenido en humedad.

La fecha de corte afectó significativamente el contenido en MS, la composición química, la digestibilidad y la concentración energética del ensilado. En líneas generales, la variación observada en los distintos cortes en la calidad del ensilaje fue semejante a la observada para el forraje fresco original. Los valores de pérdidas totales de MS, contenido en MS y en PB no fueron afectados por el uso de aditivo ( $P > 0.05$ ), cuyo efecto sobre las características de los ensilajes fue comparativamente inferior al ejercido por la fecha de corte. Se destaca el efecto del ácido fórmico, que aumentó significativamente la producción de efluente ( $P < 0.001$ ) y el nivel de pérdidas totales de MS ( $P < 0.01$ ) con relación al inoculante y al control sin aditivo, con valores del 20.9 vs 17.2 y 16.8 % del peso fresco ensilado para el efluente y de 14.8 vs 10.9 y 8.8 % para el nivel de pérdidas, respectivamente. Adicionalmente, los ensilajes tratados con fórmico mostraron concentraciones significativamente inferiores de MO (88.5 vs 90.1 y 90.1 %MS) y superiores de FND (43.5 vs 42.6 y 42.1 %MS), FAD (36.4 vs. 34.8 y 34.3 %MS) y sobre todo de IVDMO (54.2 vs 49.6 y 49.5 %MS) y ENL (1.34 vs 1.25 y 1.23 Mcal kg<sup>-1</sup> MS). Los resultados obtenidos coinciden con las observaciones de otros autores que apuntan al incremento de la producción de efluente y de pérdidas cuando se aplica ácido fórmico a forrajes de alta humedad<sup>(39)</sup> y a una mejora de la digestibilidad debido al menor gasto de carbohidratos no estructurales durante la fermentación<sup>(15)</sup>. La respuesta del uso de inoculantes sobre el nivel de pérdidas de MS en el ensilado es variable, ya que existen informes que muestran un efecto negativo, con valores de recuperación de MS inferiores a un control sin aditivo<sup>(43)</sup>, pero por lo general su efecto en condiciones de alta humedad es escaso<sup>(44)</sup>, tal como se observó en este estudio.

### Calidad fermentativa de los ensilajes

La fecha de cosecha y el uso de aditivo afectaron significativamente a los principales parámetros que definen la calidad fermentativa (Cuadro 3). Los valores de pH aumentaron con la fecha de corte, siendo diferentes entre sí en los tres aprovechamientos (F+1: 3.77, F+3: 3.94 y F+5: 4.04,  $P < 0.001$ ). Los contenidos en acético, AGV, N soluble y N-NH<sub>3</sub> fueron

inferiores ( $P<0.001$ ) en la primera fecha de corte comparado con las dos fechas posteriores, que no se diferenciaron entre sí (acético: 1.71 vs 2.54 y 2.41 %MS; AGV: 289 vs 426 y 405 mmoles  $\text{kg}^{-1}$  MS; N soluble: 32.8 vs 45.2 y 46.7 % N total; N-NH<sub>3</sub>: 3.87 vs 7.03 y 7.68 % N total). Los contenidos en láctico y etanol evolucionaron de forma contraria, siendo más elevados en los cortes más precoces en comparación con los más tardíos (láctico: 9.06, 7.66 y 6.36 %MS; etanol: 4.17, 4.92 y 3.39 %MS; F+1, F+3 y F+5 respectivamente). Los contenidos en butírico, propiónico y AGV de cadena más larga, así como de butanol y propanol fueron muy bajos en todas las fechas de corte.

**Cuadro 3:** Efecto de la fecha de corte y del uso de aditivo sobre la calidad fermentativa del ensilaje de girasol

	Efectos principales								Interacción	
	Corte				Aditivo				EEM	P
	F+1	F+3	F+5	P	TES	INOC	FORM	P		
n	15	15	15		15	15	15			
pH	3.77 <sup>c</sup>	3.94 <sup>b</sup>	4.04 <sup>a</sup>	***	3.8 <sup>b</sup>	3.77 <sup>c</sup>	4.18 <sup>a</sup>	***	0.007	***
Productos de fermentación (%MS)										
Láctico	9.06 <sup>a</sup>	7.66 <sup>b</sup>	6.36 <sup>b</sup>	***	11.2 <sup>a</sup>	11.48 <sup>a</sup>	0.35 <sup>b</sup>	***	0.481	NS
Acético	1.71 <sup>b</sup>	2.54 <sup>a</sup>	2.41 <sup>a</sup>	***	3.05 <sup>a</sup>	2.61 <sup>b</sup>	1.00 <sup>c</sup>	***	0.086	*
Propiónico	0.013	0.016	0.021	NS	0.021	0.016	0.012	NS	0.003	NS
Butírico	0.015 <sup>a</sup>	0.002 <sup>b</sup>	0.003 <sup>b</sup>	***	0.007	0.006	0.008	NS	0.001	NS
Valérico	0.002 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.005 <sup>a</sup>	*	0.003	0.002	0.001	NS	0.000	NS
Caproico	0.004	0.001	0.002	NS	0.005 <sup>a</sup>	0.002 <sup>b</sup>	0.001 <sup>b</sup>	*	0.000	NS
Isobutírico	0.003 <sup>a</sup>	0.001 <sup>ab</sup>	0.0 <sup>b</sup>	*	0.002	0.001	0.001	NS	0.000	NS
Isovalérico	0.002 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.005 <sup>a</sup>	**	0.003	0.002	0.001	NS	0.000	NS
Butanol	0.010 <sup>a</sup>	0.011 <sup>ab</sup>	0.007 <sup>b</sup>	*	0.009	0.009	0.01	NS	0.000	NS
Etanol	4.17 <sup>a</sup>	4.92 <sup>a</sup>	3.39 <sup>b</sup>	**	1.85 <sup>b</sup>	1.95 <sup>b</sup>	8.68 <sup>a</sup>	***	0.261	***
Propanol	0.18	0.15	0.09	NS	0.13	0.17	0.12	NS	0.041	NS
Ácidos grasos volátiles (mmoles $\text{kg}^{-1}$ MS)										
AGV	289 <sup>b</sup>	426 <sup>a</sup>	405.7 <sup>a</sup>	***	513.6 <sup>c</sup>	437.9 <sup>b</sup>	169.1 <sup>a</sup>	***	14.9	*
N soluble y amoniacal (% N total)										
N-Soluble	32.8 <sup>b</sup>	45.2 <sup>a</sup>	46.7 <sup>a</sup>	***	45.2 <sup>a</sup>	43.3 <sup>a</sup>	36.2 <sup>b</sup>	***	0.707	NS
N-NH <sub>3</sub>	3.87 <sup>c</sup>	7.03 <sup>b</sup>	7.68 <sup>a</sup>	***	8.18 <sup>a</sup>	6.84 <sup>b</sup>	3.57 <sup>c</sup>	***	0.161	***

n= número de observaciones; EEM= error estándar de la media; AGV= mmoles  $\text{kg}^{-1}$  MS de acético, butírico, isobutírico, propiónico, valérico e isovalérico.

(\*\*\*  $P<0.001$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*  $P<0.05$ ; NS: no significativo  $P>0.05$ ).

<sup>ab</sup> Valores afectados por distinto superíndice en la misma línea de cada efecto principal son diferentes ( $P<0.05$ ).

Una buena calidad de fermentación de ensilajes de alta humedad se define, según criterios del INRA francés o DLG alemán<sup>(45)</sup>, por valores de  $\text{pH} \leq 4.0$ , ausencia o trazas de butírico y propiónico, contenidos de acético  $< 2-3 \% \text{MS}$ , de  $\text{N-NH}_3 \leq 5-8 \% \text{N total}$  y de  $\text{N soluble} \leq 50 \% \text{N total}$ , acompañados con un contenido de AGV por debajo de  $600 \text{ mmoles kg}^{-1} \text{MS}$ . En relación a estos criterios, los resultados obtenidos en el presente trabajo reflejan una calidad de fermentación del girasol aceptable o buena en todo el ciclo de crecimiento considerado y sugiere que la mayor disponibilidad de azúcares en las fechas más precoces favorece, a pesar del mayor contenido en humedad, una mejor calidad de fermentación en comparación con el aprovechamiento más tardío, confirmando las indicaciones de los coeficientes de fermentabilidad obtenidos en estado fresco.

El ensilado testigo mostró valores de  $\text{pH}$  (3.80), AGV ( $513 \text{ mmoles kg}^{-1} \text{MS}$ ),  $\text{N soluble}$  ( $45.2 \% \text{N total}$ ) y  $\text{N-NH}_3$  ( $8.1 \% \text{N total}$ ), lo que es indicativo de una calidad fermentativa aceptable, aunque tuvo una concentración de acético algo elevada ( $3.05 \% \text{MS}$ ). Comparado con el grupo testigo, el inoculante, con relación al control, redujo significativamente ( $P < 0.001$ ) el  $\text{pH}$  (3.77) y los contenidos de acético ( $2.61 \% \text{MS}$ ), AGV ( $437 \text{ mmoles kg}^{-1} \text{MS}$ ) y  $\text{N-NH}_3$  ( $6.84 \% \text{N total}$ ), mejorando ligeramente la fermentación. Los resultados obtenidos con la aplicación de inoculante al girasol concuerdan con los de los trabajos que muestran un efecto positivo de su uso sobre la calidad de fermentación<sup>(43,46)</sup>, siendo de especial interés su efectividad aún en condiciones de alta humedad del forraje, como es el caso del presente estudio, consistentemente dicho efecto se suele observar con forrajes ensilados donde el contenido en  $\text{MS}$  es cercano al  $30 \%$  o superior<sup>(47)</sup>.

La adición de ácido fórmico redujo la intensidad de la fermentación en el ensilado, evidenciada por un valor medio de  $\text{pH}$  más elevado (4.18) y menores contenidos medios en láctico ( $0.35 \% \text{MS}$ ), acético ( $1.0 \% \text{MS}$ ), AGV ( $169 \text{ mmoles kg}^{-1} \text{MS}$ ),  $\text{N soluble}$  ( $36.2 \% \text{N total}$ ) y  $\text{N-NH}_3$  ( $3.5 \% \text{N total}$ ) significativamente diferentes ( $P < 0.001$ ) a los de los otros dos tratamientos de aditivo. Otro rasgo típico de la actividad del fórmico es la elevación del contenido en etanol, comparado con el inoculante y el testigo ( $8.68$  vs.  $1.85$  y  $1.95 \% \text{MS}$ ), lo que se atribuye a una mayor actividad de las levaduras, particularmente tolerantes a la acción del ácido fórmico<sup>(48)</sup>, ligada a la mayor disponibilidad de azúcares en una fermentación menos intensa. Coincidiendo con estas observaciones, diversos estudios han mostrado que la aplicación de ácido fórmico produce ensilajes con bajos valores de ácidos láctico y acético, y una menor proporción láctico:acético así como una menor proporción de  $\text{N amoniacal}$  sobre el  $\text{N total}$  como consecuencia de la reducción de la intensidad de los procesos proteolíticos causada por el aditivo<sup>(15, 49)</sup>.

El efecto de los diferentes aditivos sobre los parámetros fermentativos fue relativamente homogéneo en las tres fechas de corte, como se evidencia por la escasa importancia cuantitativa de las interacciones con efecto significativo sobre el  $\text{pH}$  y los contenidos de

acético, etanol, AGV y N-NH<sub>3</sub>. Mientras el efecto del ácido fórmico fue semejante en las tres fechas de corte del girasol, el efecto positivo del inoculante en la mejora de la fermentación se pone de manifiesto con mayor intensidad cuando la planta se cosecha en las proximidades de la floración probablemente debido a la mayor disponibilidad de sustrato azucarado a disposición de las bacterias lácticas añadidas al forraje, que se muestran efectivas a pesar de la mayor humedad en este momento, coincidiendo con lo anticipado por el coeficiente de fermentabilidad calculado para el forraje fresco.

Frente a la evidente mejora de la fermentación inducida por el uso de ácido fórmico se debe contraponer, por una parte, la dificultad de su aplicación por su carácter de ácido fuerte, potencialmente corrosivo y, por otra, el incremento de la producción de efluente, ya de por sí alta en el tratamiento testigo, causada por su aplicación. Desde este punto de vista y teniendo en cuenta el alto poder contaminante del efluente<sup>(50)</sup>, no sería aconsejable la utilización del ácido fórmico frente al inoculante y al control sin aditivo. Por otra parte, dada la buena calidad fermentativa del ensilaje de girasol sin conservante, la justificación del gasto en la adición de inoculante está sujeta a controversia y a pesar de la mejora en la calidad fermentativa esperada, su uso debería confrontarse, en términos económicos, con la mejora de la productividad de los animales alimentados con los distintos tipos de ensilajes, aspecto que se sitúa fuera del objeto.

## **Conclusiones e implicaciones**

El ensilaje de girasol presenta un buen contenido energético y moderado de proteína. La fecha de corte afecta a la materia seca y energía, incrementándose a mayor edad de la planta, pero se minimizan el porcentaje de la primera. Como resultado del escaso margen de ventaja en términos de calidad de ensilado con el uso de aditivos, es necesario realizar análisis de costo-beneficio al respecto. Por su concentración de nutrientes, sus valores de composición química y características fermentativas, el ensilado de girasol puede ser un forraje complementario en la alimentación de vacas lecheras, pero el alto contenido en aceite en las proximidades del momento óptimo de cosecha puede representar una limitante en su utilización en la dieta.

## **Agradecimientos y conflictos de interés**

Trabajo financiado por los proyectos ATT 2016/106 de la Xunta de Galicia y RTA2012-00065-05-02 del INIA. Aurora Sáinz-Rodríguez fue beneficiaria de una ayuda de

CONACYT para realizar una estancia formativa en el CIAM. Los autores señalan la ausencia de conflictos de interés.

## Literatura citada:

1. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Planeación agrícola nacional 2017-2030, Oleaginosas. México. 2017.
2. CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. Estadísticas Agrícolas de los Distritos de Riego Año Agrícola 2013-2014. Secretaría de Medio Ambiente y Comisión Nacional del Agua. México. 2017.
3. Bravo-Quirino F. Guía para el aprovechamiento del girasol como forraje. Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria del Estado de México. México. 2014.
4. Panciera MT, Kunkle WE, Fransen MT. Minor silage crops In: Buxton DR, *et al.* editors. Silage science and technology. American Soc Agronom Inc., Crop Science Soc. of America Inc, Madison, Wisconsin, USA. 2003.
5. Fransen SC. Corn and sunflower intercropped for silage. Proc Northwest Dairy Shortcourse. Pullman, USA. Washington State Univ. 1987.
6. Park CS, Marx GD, Moon YS, Wiesenborn D, Chang KC, Hofman VL. Alternative uses of sunflower. In: Schneiter AA. editor. Sunflower technology and production. Agronom Monogr ASA, CSSA and SSSA. Madison, WI, USA. 1997.
7. Donaldson E, Henderson AR, Edwards RA, Harper FF. Studies on sunflower silage. Edinburg School of Agriculture. 1980.
8. Demarquilly C, Andrieu J. Chemical composition, digestibility and ingestibility of whole sunflower plant before and after ensiling. Ann Zootech 1972;21(2):147-162.
9. Gonçalves LC, Tomich TR, Pereira LGR. Produção e utilização de silagem de girassol. Simpósio: Forragicultura e Pastagens. Lavras Anais Lavras. UFLA. 2000.
10. Weissbach D. The silaging qualities of sunflowers. Green Chemistry ADDCON. 2007. <http://www.addcon.com/en/feed/silage-additives/ensiling-tips/sunflowers/> Accessed Feb 28, 2018.
11. Tomich TR, Gonçalves LC, Tomich RGP, Rodrigues JÁ, Borges I. Características químicas e digestibilidade *in vitro* de silagens de girassol. R Bras Zootec 2004;33(6):1672-1682.

12. Edwards RA, Harper F, Henderson AR, Donaldson E. The potential of sunflower as a crop for ensiling. *J Sci Food Agric* 1978;(29):332-338.
13. Wilkinson JM, Muck RE. The future of ensiling: challenges and opportunities. In: Gerlach K, Südekum KH Editors. *Proc. XVIII Int. Silage Conf. Germany*. 2018.
14. Jones BA, Hatfield RD, Muck RE. Effect of fermentation and bacterial inoculation on lucerne cell walls. *J Sci Food Agric* 1992;(60):147-153.
15. Mayne CS. The effect of formic acid, sulphuric acid and a bacterial inoculant on silage fermentation and the food intake and milk production of lactating dairy cows. *Anim Prod* 1993;56(1):29-42.
16. Mayne CS, Steen RWJ. Recent research on silage additives for milk and beef production. 63rd Annual Report 1989-1990, Agricultural Research Institute of Northern Ireland, 1990.
17. McDonald P, Henderson AR, Heron SJE. *The biochemistry of silage*. 2nd ed. Marlow, England: Chalcombe Publ. 1991.
18. Schneiter AA, Miller JF. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci* 1981;(21):901-903.
19. Flores G, González A, Castro J. Evaluación de la utilidad de los silos a pequeña escala para experimentación en calidad de ensilados. *Actas de la XXXVII R.C. SEEP*. España 1997.
20. Pereira S, Fernández B, Valladares J, Díaz N, Resch C, González A, Flores G. Evolución del rendimiento y calidad del girasol (*Helianthus annuus* L.), aprovechado para forraje tras la floración y desarrollo de calibraciones NIRS para la predicción del valor nutricional de los componentes morfológicos. *Pastos* 2014;44(2):19-30.
21. Playne MJ, McDonald P. The buffering constituents of herbage and of silage. *J Sci Food Agric* 1966;17(6):264-268.
22. Weissbach F, Schmidt L, Hein E. Method of anticipation of the run fermentation in silage making, based on the chemical composition of the green fodder. *Proc 12th Int Grassld Congress*. Moscow. 1974.
23. Dulphy JP, Demarquilly C. Problèmes particuliers aux ensilages In: INRA editor. *Prévision de la valeur nutritive des aliments des ruminants*. París, Francia. 1981: 81-104.
24. Flores G, Arráez AG, Castro J, Castro P, Cardelle M, Fernández B, Valladares J. Evaluación de métodos de laboratorio para la predicción de la digestibilidad in vivo de



- la materia orgánica de ensilajes de hierba y planta entera de maíz. Pastos 2005;(32):5-99.
25. FEDNA. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Tablas de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. 3ª ed. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. España. 2010.
  26. Valdez FR, Harrison JH, Fransen SC. Effect of feeding corn-sunflower silage on milk production, milk composition, and rumen fermentation of lactating dairy cows. J Dairy Sci 1988;71(9):2462-2469.
  27. Stern M, Endres M. Laboratory manual. Research techniques in ruminant nutrition. Dep Anim Sci. University of Minnesota. USA. 1991.
  28. Sáinz-Ramírez A, Botana A, Valladares J, Pereira S, Veiga M, Resch C, Flores G. Efecto de la variedad y de la fecha de corte sobre el rendimiento y el valor nutricional del girasol cosechado para ensilar en la zona atlántica de Galicia. 56a RC SEEP. Barcelona. 2017.
  29. Flores G, Botana A, Pereira S, Valladares J, Pacio B, Aguión A, Resch C. Efecto del momento de corte sobre el rendimiento y valor nutricional de dos tipos de girasol (una variedad forrajera y otra de aceite) cultivados para ensilar a finales de verano en Galicia. Afriga 2016;(121):184-200.
  30. Tosi H, Silveira AC, Faría VP, Pereira RL. Avaliação do girassol (*Helianthus annuus*) como planta para a ensilagem. Rev Soc Bras Zootec 2016;4(1):39-48.
  31. Gonçalves LC, Rodriguez NM, Pereira LGR, Rodrigues JAS, Borges I, Borges ALCC, Saliba EOS. Evaluation of different harvest times of four genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.) for ensiling. FAO Electronic Conference on Tropical Silage <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gp/silage/PDF/7P5.pdf>. Accessed Dec 15, 2017.
  32. Hill JAG, Fleming JS, Montanhini Neto R, Camargo H, Flemming DF. Valor nutricional do girassol (*Helianthus annuus* L.) como forrageira. Arch Vet Sci 2003;8(1):41-48.
  33. Mello R, Nörnberg JL, Restle J, Neumann M, César-Queiroz A, Barcellos-Costa P, Rodrigues-Magalhães AL, Bitencourt de David D. Características fenológicas, produtivas e qualitativas de híbridos de girassol em diferentes épocas de semeadura para produção de silagem. R Bras Zootec 2006;35(3):672-682.
  34. Romero LA, Mattera J, Redolfi F, Gaggiotti M. Silaje de girasol: efecto del momento de corte sobre la producción y la calidad. Rev Arg Prod Anim 2009;29(1):401-610.
  35. Peiretti PG, Meineri G. Evolution of Chemical Composition, Nutritive Value and Fatty Acids Content of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) during the Growth Cycle. J Anim Vet Adv 2010;9(1):112-117.

36. Pitzz JW, Kaiser AG. Principles of Silage preservation. In: Kaiser AG *et al.* editors. Topfodder Successful Silage. New South Wales, Australia. 2004.
37. Rotz CA, Ford SA, Buckmaster DR. Silages in farming systems. In: Buxton DR, *et al* editors. Silage Science and Technology, Madison, WI, USA: Agronomy Publication 42, Am Soc Agronom. 2003.
38. Michalet-Doreau B, Demarquilly C. Pr evision de la valeur  nerg tique des ensilages d'herbe. In: INRA editor. Pr evision de la valeur nutritive des aliments des Ruminants. publications, Paris, Francia. 1981.
39. Haigh PM. Effluent production from grass silages treated with additives and made in large-scale bunker silos. Grass Forage Sci 1999;(543):208-218.
40. Harris CF, Raymond WF. The effect of ensiling on crop digestibility. Grass Forage Sci 1963;(18):204-212.
41. Demarquilly C, Dulphy JP, Andrieu JP. Valeurs nutritive et alimentaire des fourrages selon les techniques de conservation: foin, ensilage, enrubannage. Fourrages 1998;(155): 349-369.
42. Rogers GL, Bryant AM, Jury KE, Hutton JB. Silage and dairy cow production, N Z J Agric Res 1979;22(4):511-522.
43. Kung L, Muck RE. Animal Response to silage additives Proce Silage: Field to Feedbunk, North American Conference. 1997.
44. Gordon FJ. An evaluation through lactating cattle of a bacterial inoculant as an additive for grass silage. Grass Forage Sci 1989;(44):169-179.
45. Pflaum J, Gartner L, Demarquilly C, Andrieu JP. Silage additive testing: Comparison of the German DLG and the French INRA schemes BLT, Grub, Poing (Germany). 1996.
46. Oliviera AS, Weinberg ZG, Ogunade IM, Cervantes AP, Arriola KG, Jiang Y, Kim D, Li M. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. J Dairy Sci 2017;(100):4587-4603.
47. Kung LJ, Tung RS, Maciorowski KG, Buffum K, Knutsen K, Aimutis WR. Effects of plant cell-wall-degrading enzymes and lactic acid bacteria on silage fermentation and composition. J Dairy Sci 1991;(74):4284-4296.
48. Henderson AR, McDonald P, Woolford MK. Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass treated with formic acid. J Sci Food Agr 1972;(23):1079-1087.

49. Nagel SA, Broderick GA. Effect of formic acid or formaldehyde treatment of alfalfa silage on nutrient utilization by dairy cows. *J Dairy Sci* 1992;(75):140-154.
50. Wilkinson JM, Toivonen, MI. *World silage: a survey of forage conservation around the world*. Chalcombe Publications, Lincoln, Reino Unido. 2003.