

AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN ENSILAJES DE SOYA¹

Carlos Tobía^{2/*}, Lidieth Uribe^{**}, Enrique Villalobos^{***}, Henry Soto ^{****}, Isabelle Ferris^{**}

Palabras clave: Ensilaje de soya, bacterias ácido lácticas (BAL), melaza de caña, deshidratación parcial de follaje.

Key words: Soybean silage, lactic acid bacteria (BAL); sugarcane molasses, forage partial dehydration.

RESUMEN

Plantas enteras de soya (*Glycine max* L. Merr.), cosechadas en el estado R6 (semillas completamente llenas) y seccionadas en trozos de aproximadamente 2 cm. fueron ensiladas en microsilos de 1 kg, con y sin deshidratación parcial (DP); a los silos se les añadió 0, 4, y 8% de melaza de caña azúcar. Se observó una respuesta lineal ($P \leq 0,0001$) en la disminución del pH concomitantemente con el incremento en la concentración de melaza. Del mismo modo, los contenidos de materia seca (MS) se incrementaron al aumentar la concentración de melaza en los ensilajes. La DP concentró en 10 unidades porcentuales el contenido de MS. No se observó interacciones entre la DP y la concentración de melaza. Los aislamientos bacterianos fueron realizados en los microsilos con 4 y 8% de melaza y sin DP, debido a que éstos presentaron las mejores características sensoriales, los menores valores de pH y la menor diversidad de morfotipos bacterianos. Los cultivos se hicieron en agar Rogosa y a las colonias seleccionadas se les efectuó las pruebas de Gram y catalasa; las que correspondieron a bacilos Gram positivos y catalasa negativos, fueron inoculadas en galerías Api 50 CHL[®], para su identificación como bacterias ácido lácticas (BAL). Las cepas aisladas correspondieron a *Lactobacillus brevis* 3.

ABSTRAT

Isolation, selection and characterization of lactic acid bacteria in soybean silage. Whole soybean plants (*Glycine max*. L. Merr) harvested at the R6 state of development (full seed stage) were chopped in 2 cm pieces and stored in 1 kg microsilos, with and without previous partial dehydration (PD). Molasses at concentrations of 0, 4, and 8% were added to facilitate fermentation. A lineal decrease in pH ($P \leq 0,0001$) in response to an increased in molasses concentration was found. On the other hand, dry matter (DM) concentration also increased concomitantly with the concentration of molasses in the microsilos and the PD treatment (10%). No PD x molasses concentration interaction was found. Bacterial isolations were performed in microsilos with 4 and 8% molasses and without PD, because these experimental units showed the best sensorial characteristics, lower pH and lower bacterial morphotype diversity. Bacterial isolates were obtained from Rogosa agar; those corresponding to Gram positive bacilli, and catalase negative, were inoculated in Api 50 CHL[®] galleries for their identification as lactic acid bacteria (BAL). The isolated colonies were *Lactobacillus brevis* 3.

1/ Recibido para su publicación el 14 de mayo del 2003
2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: carlostobia@yahoo.com

* Estudiante del Programa de Doctorado en Sistemas de Producción Agrícola Tropical Sostenible. Universidad de Costa Rica. Facultad de Ciencias Agroalimentarias.

** Centro de Investigaciones en Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

*** Centro de Investigación en Granos y Semillas, San José. Costa Rica. Universidad de Costa Rica.

**** Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

El ensilaje es un método de conservación de forrajes con alto contenido de humedad, que se fundamenta en la fermentación ácido láctica espontánea del forraje bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias ácido lácticas (BAL), propias del material a ensilar, fermentan los carbohidratos solubles del forraje, produciendo principalmente ácido láctico y, en menor grado, ácido acético (Stefanie *et al.* 1999).

El éxito del proceso fermentativo que ocurre en los ensilajes depende, principalmente, de una cantidad suficiente de BAL y de una concentración adecuada de carbohidratos solubles en el forraje que genera el ácido láctico. De esta manera, el pH se mantiene bajo y el ensilaje se preserva mejor (Jaster 1995).

El forraje de soya alcanza su máximo desarrollo y producción de materia seca en $t\ ha^{-1}$ en el estado reproductivo R6. En este período el material cosechado presenta los contenidos más altos de proteína y energía (Fehr y Caviness 1980), estas características lo definen como un material con excelente potencial forrajero. Es importante señalar que en este estado de desarrollo se maximiza además, el aprovechamiento de la fijación simbiótica del nitrógeno (Harper 1974). La calidad nutricional de este material es similar al forraje de alfalfa y las prácticas de manejo usualmente utilizadas para la producción de semilla comercial, pueden usarse también para lograr la mayor producción de forraje (Hintz y Albrecht 1994).

Las leguminosas son consideradas materiales difíciles para ensilar. Esto se debe principalmente a su bajo contenido de carbohidratos solubles y a su alta capacidad alcalinizante (Bolsen *et al.* 2001). Por otro lado, los contenidos altos de humedad del material a ensilar afectan negativamente la calidad fermentativa de los ensilajes. Así, la eliminación parcial de agua de los forrajes (deshidratación parcial) permite concentrar el porcentaje de materia seca (MS) del material. Además, con la deshidratación parcial (DP) del forraje se reduce la incidencia de la fermentación secundaria del material, caracterizada por el aumento de los contenidos de ácido butírico y del nitrógeno amoniacal

del ensilado (Wilkinson 1983). También, la DP induce la pérdida de CO_2 , producto de la respiración que sufre el forraje cortado en el campo. Wilkinson (1981) señala que esta pérdida por respiración equivale al 2-3% de la MS en los ensilados tratados con DP. Este mismo autor, menciona pérdidas totales de MS de 19 y 21% para ensilajes manejados adecuadamente sin DP y con este tratamiento, respectivamente.

Los inóculos bacterianos promueven una fermentación rápida y eficiente de los materiales ensilados, lo cual incrementa la calidad y cantidad del producto final. Estos aditivos presentan algunas ventajas sobre otros tipos de aditivos (granos, subproductos de arroz y de trigo, melaza de caña de azúcar, ácido propiónico, ácido fórmico, di-acetato de sodio y las enzimas celulasa y hemicelulasa), tales como su bajo costo, la seguridad en su manejo, su baja tasa de aplicación por cantidad de forraje picado, así como el hecho de no contaminar el ambiente (Bolsen *et al.* 2001).

Las ventajas antes mencionadas están correlacionadas con los beneficios económicos que se obtiene por los incrementos en la producción de leche y carne (Muck y Kung 1997). Bolsen *et al.* (2001) mencionan el beneficio económico que se deriva del uso de inóculos bacterianos aplicados a ensilajes de maíz y alfalfa. Estos autores señalan incrementos de 6 a 10 y de 14 a 15 dólares por tonelada de maíz y de alfalfa ensilados, respectivamente, producto de las mejoras en la preservación y en la utilización del ensilaje en la alimentación de las vacas de leche.

Singh *et al.* (1996), ensilaron alfalfa (*Medicago sativa* L.) en la región tropical de la India adicionándole BAL (*Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus plantarum*), con lo que lograron una disminución en la concentración del ácido butírico. No obstante, los ensilajes de mayor calidad fueron obtenidos cuando se combinó la inoculación biológica con la aplicación de melaza de caña.

Es factible producir inóculos bacterianos a partir de forrajes tropicales. La literatura señala que cada cepa inoculante debe ser aislada del cultivo que se va a ensilar (Muck y Kung 1997). Estos autores encontraron que los mejores inoculantes se

han obtenido de las cepas provenientes del jugo de la misma familia de plantas que va a ser ensilada.

Los objetivos de esta investigación fueron aislar y caracterizar las bacterias ácido lácticas (BAL) que se desarrollan en los ensilajes de soya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Forraje de soya (*Glycine max* L. Merr.)

Se utilizó la variedad de soya (CIGRAS 06), que fue desarrollada para condiciones tropicales, por poseer los genes de floración retardada en condiciones de días cortos (Hartwig y Kihl 1979, Villalobos y Camacho 1999). Las plantas fueron cosechadas en el estado R6 (Fehr y Caviness 1980), reconocido por Hintz y Albrecht (1994) como el estado óptimo de desarrollo para su utilización como forraje. El material se cosechó a los 90 días y fue cortado posteriormente en una picadora en secciones de aproximadamente 2 cm.

Microsilos y tratamientos

Una porción de forraje fue deshidratada parcialmente (DP) al exponerla al sol por 2 horas inmediatamente después de la corta; la otra porción se ensiló sin DP. Ambos grupos fueron divididos en 3 subgrupos a los que se les aplicó melaza en concentraciones de 0 (testigo), 4 y 8% (expresado en base fresca). Muestras de 1 kg de todas las posibles combinaciones de tratamientos fueron depositadas en microsilos, que consistieron de bolsas de plástico transparente de 0,063 mm de grosor, a las cuales se les extrajo el aire mediante una bomba de vacío y de inmediato fueron selladas herméticamente.

Lo microsilos se distribuyeron en un arreglo factorial 3x2, en un diseño irrestricto al azar. Los factores fueron: 3 concentraciones de melaza (0, 4 y 8%) y los 2 tratamientos de deshidratación parcial (con y sin DP), generando así 6 tratamientos que fueron repetidos 4 veces, para un total de 24 unidades experimentales. Las bolsas fueron colocadas en posición vertical en una estantería en condiciones controladas de 23°C y a 65% de humedad relativa.

Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL)

Para aislar las BAL, se colectó muestras de ensilaje en cada microsilos, exceptuando aquellos que por efecto del tratamiento correspondiente mostraban características sensoriales pobres (olor putrefacto y textura pegajosa) y altos valores de pH (> 5,0), lo cual generalmente es una consecuencia del desarrollo de organismos indeseables, como, *Clostridium* spp, que es agente causal de enfermedades en los animales y en el hombre.

Las muestras fueron recogidas en recipientes estériles y llevadas al Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), para su procesamiento. De cada microsilos se tomó muestras de 10 g del material y fueron colocadas en recipientes que contenían 90 ml de agua estéril.

Posteriormente, las muestras se homogeneizaron y se les determinó los valores de pH. De cada muestra se obtuvo una alícuota de 0,1 ml que se cultivó en platos de agar Rogosa, medio selectivo para BAL (Rogosa *et al.* 1951). Los platos fueron incubados durante 5 días a 30°C en una atmósfera enriquecida con CO₂. A partir de cada plato se separó por rayado los diferentes morfotipos coloniales. Los platos se incubaron en la forma ya descrita. Después de 3 pasajes en platos de agar Rogosa, los diferentes morfotipos fueron inoculados en tubos de agar Rogosa y se procedió a identificar las colonias por medio de las pruebas de Gram, catalasa y una galería de pruebas Api 50 CHL® (Holt *et al.* 1994).

Por otra parte, de cada microsilos se tomó una muestra para determinar la materia seca a 60°C por 48 horas (AOAC 1990).

Conservación de los aislamientos bacterianos

Cada una de las cepas seleccionadas fue inoculada en tubos de ensayo con agar Rogosa y se almacenó a 5°C. Para su conservación a largo plazo, las cepas fueron congeladas a -70°C en glicerol al 20%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características sensoriales del ensilaje, son una herramienta subjetiva que permite valorar la calidad del ensilaje en el campo de una manera rápida, económica y sencilla. Los indicadores considerados para evaluar estas características son, en orden de importancia: olor, color y textura (Ojeda *et al.* 1991, Cuadro 1). El indicador color, no fue valorado en este experimento, ya que la melaza utilizada como aditivo, enmascara su valoración, dándole una apariencia color café (no deseada) al producto ensilado. Empleando estos indicadores, se seleccionó los tratamientos con 4 y 8% de melaza sin DP para aislar las BAL, por presentar en la evaluación sensorial un olor acético (36%), con una textura de fácil separación (22%). Por otra parte, en los tratamientos donde se incluyó melaza, se presentó un coeficiente de indicador sensorial mayor a 76%, mientras que en aquellos tratamientos en donde no se incluyó este aditivo el valor fue apenas el 38% del coeficiente total del indicador sensorial. Estos resultados coinciden con los mencionados por Vallejo (1995), en follajes de árboles y arbustos tropicales, donde la adición de melaza también mostró un efecto beneficioso significativo.

Cuadro 1. Calificación de indicadores sensoriales de un ensilaje.

Indicador	Descripción	Puntaje %	Máximo por indicador %
Olor	Agradable (láctico)	54	54
	Poco agradable (acético)	36	
	Desagradable (butírico-putrefacto)	18	
Color	Verde, verde amarillento y verde claro	24	24
	Verde rojizo, verde pardo y verde oscuro	16	
	Pardo amarillento, café verdoso y café oscuro	8	
	Bien definido, se separa fácil	22	
Textura	Jabonoso al tacto, mal definido	11	22
Total (%)			100

Ojeda *et al.* (1991)

En general, las leguminosas presentan bajos contenidos de carbohidratos solubles (Bolsen *et al.* 2001). Por esta razón, es necesario añadirle una fuente de carbohidratos solubles, con la finalidad que las BAL aceleren el proceso fermentativo, incrementándose, así la producción de ácidos grasos volátiles (principalmente ácido láctico y, en menor grado, ácido acético); lo que le confiere un olor agradable al producto ensilado. El tratamiento con 0% de melaza presentó un olor putrefacto de todo el material. Vallejo (1995) encontró, en ensilajes de follajes de árboles y arbustos tropicales, una reducción en la producción de amoníaco cuando se le adiciona melaza a estos materiales. La misma tendencia se observó en pasto Bermuda cuando se le adicionó melaza de caña (Umaña *et al.* 1991).

La inclusión de melaza disminuyó significativamente el pH ($P \leq 0,05$) en los tratamientos con y sin DP. De igual manera, se pudo observar que la inclusión de melaza al 4 y 8% en los tratamientos sin DP, favoreció la concentración del contenido de MS en 10% aproximadamente, pues pasó de 33 a 37% (Cuadro 2). Tendencias similares fueron encontradas en microsilos de alfalfa (Singh *et al.* 1996), en ensilajes de morera (Ojeda y Montejó, 2001) y en microsilos de pasto Elefante (Vargas 1979). Esto posiblemente se debió a la mayor concentración de MS que tiene

Cuadro 2. Valores de pH y contenidos de materia seca con y sin deshidratación parcial en microsilos de forraje de soja con 3 concentraciones de melaza.

% Melaza	pH	% MS 60°C
Sin DP		
0	5,45 ± 0,08 ^a	33,00 ± 2,12 ^a
4	4,46 ± 0,12 ^b	37,16 ± 1,20 ^b
8	4,22 ± 0,09 ^c	37,44 ± 2,26 ^b
Con DP		
0	5,47 ± 0,26 ^a	44,32 ± 0,53 ^c
4	4,57 ± 0,10 ^b	46,27 ± 2,39 ^c
8	4,41 ± 0,04 ^c	46,49 ± 2,83 ^c

DP = Deshidratación parcial

Todos los valores corresponden al promedio de 4 muestras ± Intervalo de confianza 95%

Medias con letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas, según la prueba de

Duncan ($P \leq 0,05$)

la melaza (75%), que al incorporarla a razón de 4 y 8% a los forrajes de soya (33% de MS), incrementa el contenido total de MS de los ensilajes de soya. Por otra parte, en los tratamientos donde se aplicó DP, no se observó un incremento significativo en los contenidos de MS cuando se adicionó melaza, ya que la DP concentró previamente los contenidos de MS del forraje de soya.

No se observó ningún efecto positivo en el pH ni en los aislamientos de BAL en los microsilos de soya, cuando el forraje fue previamente expuesto durante 2 horas a pleno sol (DP). Sin embargo, el contenido de materia seca (MS) fue concentrado en 10 unidades porcentuales. Vallejo (1995), señala concentraciones del contenido de MS en 25 unidades porcentuales en diferentes follajes de árboles y arbustos cuando son expuestos al sol de 24 a 48 horas. Este tratamiento con DP puede resultar de mucha utilidad, en épocas de verano, cuando se pretende ensilar forrajes con contenidos de MS menores al 20%.

Características morfológicas e identificación de las bacterias ácido lácticas

Los aislamientos provenientes de los tratamientos seleccionados (4 y 8% sin DP) con las mejores características sensoriales y los valores más bajos de pH y que además, en sus pruebas microbiológicas correspondieron a bacilos Gram positivos y catalasa negativos, fueron analizados con más detalle. Estos tratamientos presentaron una flora microbiana homogénea, con pocos morfotipos de colonias que presentaban características típicas de BAL.

Se evaluó en forma aislada microsilos de soya con 12% de melaza sin DP, con el objetivo de observar si existía un cambio en la flora bacteriana, haciendo la salvedad que este tratamiento no sería económicamente rentable por el alto costo de la melaza (Cuadro 3). Por ejemplo, en la actualidad hacer un silo de forraje de soya con 4, 8 y 12% de melaza, calculado en base fresca, representa un costo adicional de 17, 34 y 51% del total de los costos de producción del ensilaje, respectivamente.

Cuadro 3. Características morfológicas de las bacterias ácido lácticas aisladas en los microsilos de forraje de soya con 4, 8 y 12% de melaza sin deshidratación parcial.

Cepas	Melaza %	Color de las cepas	Morfología de las colonias
A	8	Blanca brillante	Bacilos largos y delgados, colonias umbonadas con borde entero
B	4 y 8	Blanca brillante	Bacilos cortos y gruesos, centro denso, con apariencia a leche condensada
C	12	Crema	Bacilos cortos y delgados, colonias umbonadas
D	8	Crema brillante	Bacilos cortos y gruesos, colonias circulares y convexas

En los tratamientos con 0% de melaza, empleando o no DP, se observó 5 morfotipos coloniales, ninguna de las colonias presentó características típicas de *Lactobacillus* (Gram positivo, catalasa negativa). Ello coincide con las características del material, olor putrefacto (18%), textura pegajosa (11%) (Cuadro 1), y altos valores de pH, condiciones que favorecieron la proliferación de otras bacterias.

Cuando se aplicó DP se observó diferentes morfotipos coloniales con la presencia de organismos Gram positivos, Gram negativos y levaduras. Debido a lo diverso de la flora microbiana presente en el material, no se seleccionó cepas de BAL a partir de estos tratamientos. Esta diversidad posiblemente se debió a una menor concentración de carbohidratos solubles, producto de la pérdida de CO₂ por la prolongación del proceso respiratorio del material (2 horas de exposición al sol) y al aumento de la presión osmótica del material por la pérdida de agua del forraje de soya con DP. Esto creó condiciones propicias para el desarrollo de levaduras y otro tipo de microorganismos no deseables.

En la figura 1 se observa una respuesta lineal significativa en la disminución del pH ($P \leq 0,0001$) a medida que se incrementa la concentración de melaza. En el mismo gráfico, podemos

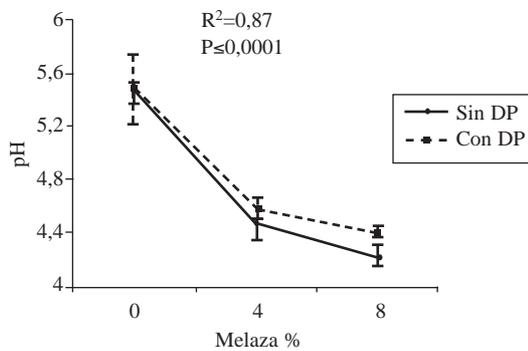


Fig. 1. Efecto de la concentración de melaza sobre el pH del ensilaje de soja con y sin deshidratación parcial (DP). Ecuación de predicción: $\text{pH} = 5,320417 - 0,152813 (\% \text{ melaza})$

observar que la concentración de melaza y la DP no tienen un efecto aditivo sobre los valores de pH menores. Vallejo (1995), no observó una interacción significativa entre la aplicación de melaza y la DP en ensilajes de forrajes de árboles y de arbustos tropicales, recomendando el uso de uno u otro dependiendo de las características del material que se va a ensilar.

Las cepas aisladas fueron inoculadas en una galería para identificar BAL (Api 50 CHL[®]), la cual permite determinar el patrón de fermentación de los 50 carbohidratos que contiene la prueba.

Las cepas A y D presentaron 92% de coincidencia con el patrón de fermentación del *Lactobacillus brevis* 3, y, las cepas B y C, 91 y 90% de coincidencia para el mismo microorganismo, respectivamente.

Es importante mencionar que la industria actualmente no distribuye inóculos comerciales específicos para ser utilizados en los silos de leguminosas, en los que los carbohidratos solubles predominantes son las pentosas. Por otra parte, los inoculantes que se comercializan en el mercado latinoamericano, son fabricados con microorganismos aislados a partir de los jugos vegetales de los ensilajes de maíz y sorgo (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* y *Streptococcus faecium*). Estas BAL son clasificadas como organismos homofermentativos, que degradan las hexosas (carbohidratos solubles

que predominan en mayor proporción en las gramíneas) a ácido láctico (McDonald 1981).

Con esta investigación se pretende poner a la disposición de los productores de bovinos de carne y leche, inóculos bacterianos específicos para ensilar forrajes que normalmente son difíciles de ensilar como son: leguminosas y forrajes tropicales. Por otra parte, este tipo de tecnología, serviría como herramienta para conservar materiales de alto valor nutritivo, que al incorporarse a las raciones alimenticias, disminuiría el costo de la alimentación, ya que utilizaría una menor cantidad de alimento balanceado (materias primas importadas). Lo que contribuiría a una menor dependencia de insumos importados en los sistemas de producción bovina.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al M.Sc. Fermín Subirós por su desinteresada colaboración y a la empresa Azucarera el Viejo S.A., por el uso de sus instalaciones, materiales y equipos.

LITERATURA CITADA

- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemistry). 1990. Official methods of analysis. 15 ed. Washington, D.C. 1008 p.
- BOLSEN K., BRENT B., URIARTE E. 2001. The silage triangle and important practices often overlooked. California Animal Nutrition Conference. California EE.UU. p. 60-65.
- FEHR W., CAVINESS C. 1980. Stages of soybean development. Iowa Cooperation Service Special Rep. 80.12 p.
- HARPER J. 1974. Soil and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybean production. Crop Science 14: 255-260.
- HARTWIG E., KIHLE R. 1979. Identification and utilization of a delayed flowering character in soybeans for short-day conditions. Field Crops Research 2:145-151.
- HINTZ R., ALBRECHT K. 1994. Dry matter partitioning and forage nutritive value of soybean plant components. Agronomy Journal 86:59-62.

- HOLT J., KRIEG N., SNEATH P., SPALEY J., WILLIAMS F. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 Ed. Baltimore, EE.UU. p. 565-570.
- JASTER E. 1995. Legume and grass silage preservation. *In*: Post-harvest physiology and preservation of forages. Ed. by K. Moore, M. Peterson, D. Kral; M. Viney. Wisconsin, EE.UU., CSSA Special Publication 22, p. 91-115.
- McDONALD P. 1981. The biochemistry of silage. John Wiley and sons. Chichester, New York, EE.UU. 226 p.
- MUCK R., KUNG L. 1997. Effects of silage additives on ensiling proceedings from the silage: field to feedbunk. North American Conference. Hershey, Pennsylvania, EE.UU., February 11-13 p. 187-199.
- OJEDA F., MONTEJO I. 2001. Conservación de la morera (*Morus alba*) como ensilaje. I. Efecto sobre los compuestos nitrogenados. *Pastos y Forrajes* 24:147-155.
- OJEDA F., CACERES O., ESPERANCE M. 1991. Conservación de forrajes. Editorial Pueblo y Educación. Cuba. 80 p.
- ROGOSA M., MITCHELL J., WISEMAN R. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *Journal of Bacteriology* 62:132.
- SINGH A., EDWARD J., MOR, S., SINGH K. 1996. Chemical and microbiological change during ensiling of Lucerne with lactic acid bacteria and molasses. *Indian Journal Dairy Science* 49(9):593-598.
- STEFANIE J., DRIEHUIS F., GOTTSCHAL, J., SPOELSTRA S. 1999. Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Electronic Conference on Tropical Silage*, <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/agp/agpc/gp/silage/contents.htm>. Paper 2.
- UMAÑA R., STAPLES C., BATES D., WILCOX C., MAHANNA W. 1991. Effects of a microbial inoculant and (or) sugarcane molasse on fermentation, aerobic stability and digestibility of Bermuda grass ensiled at two moisture contents. *Journal of Animal Science* 69(11):4588-4601.
- VALLEJO M. 1995. Efecto del premarchitamiento y la adición de melaza sobre la calidad del ensilaje de diferentes follajes de árboles y arbustos tropicales. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), C.R. 117 p.
- VARGAS R. 1979. Determinación de la composición química y el valor nutritivo del pasto elefante (*Pennisetum purpureum*) ensilado en microsilos con tres niveles de melaza. Tesis Lic. Facultad de Agronomía Universidad de Costa Rica 75 p.
- VILLALOBOS E., CAMACHO F. 1999. Avances en el mejoramiento genético de la soya en Costa Rica. II. CIGRAS-06 y CIGRAS-10, dos nuevas variedades tropicales. *Agronomía Costarricense* 23(1):61-67.
- WILKINSON J. 1983. Valor alimenticio de las forrajeras ensiladas de clima tropical y templado. Parte II. Técnicas para aumentar el valor alimenticio del ensilado. *Revista Mundial de Zootecnia* 46:35-40.
- WILKINSON J. 1981. Losses in the conservation and utilization of grass and forage crops. *Annals of Applied Biology* 98:365-375.