

Caracterización microbiana y dinámica de crecimiento poblacional de bacterias ácido lácticas en ensilajes de maíz (*Zea Mays*) y alfalfa

Microbial characterization and population growth dynamics of lactic acid bacteria in corn (Zea Mays) and alfalfa silages

Denise Dayana Guevara Arevalo ¹, Angel Virgilio Cedeño Moreira ², Milena Anahis Cerezo Alejandro ³, Jairo Eloy Velaña Navarrete ⁴, Cesar Luis Noboa Marin ⁵ y Ítalo Fernando Espinoza Guerra ⁶

¹ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0009-0009-7087-9122>

² Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0000-0002-6564-5569>; acedenom@uteq.edu.ec

³ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0009-0000-0735-2007>; milena.cerezo2016@uteq.edu.ec

⁴ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0009-0003-8149-5200>; jairo.velana2017@uteq.edu.ec

⁵ Universidad de Guayaquil, Ecuador, Guayaquil; <https://orcid.org/0009-0003-9052-8481>; cesar.noboam@ug.edu.ec

⁶ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, Quevedo; <https://orcid.org/0000-0002-2975-3087>; iespinoza@uteq.edu.ec

Cita: Guevara Arevalo, D. D., Cedeño Moreira, A. V., Cerezo Alejandro, M. A., Velaña Navarrete, J. E., Noboa Marin, C. L., & Espinoza Guerra, Ítalo F. (2026). Caracterización microbiana y dinámica de crecimiento poblacional de bacterias ácido lácticas en ensilajes de maíz (*Zea Mays*) y alfalfa. *Horizon Nexus Journal*, 4(2), 25-41. <https://doi.org/10.70881/hnj/v4/n2/122>

Recibido: 01/03/2026

Revisado: 04/04/2026

Aceptado: 06/04/2026

Publicado: 21/04/2026



Copyright: © 2026 por los autores. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la **Licencia Creative Commons, Atribución-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)**.

(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

* Correspondencia: denise.guevara2016@uteq.edu.ec; acedenom@uteq.edu.ec.

 <https://doi.org/10.70881/hnj/v4/n2/122>

Resumen: La inclusión de leguminosas en mezclas ensiladas aporta beneficios nutricionales, pero plantea un reto fermentativo por la alta capacidad tampón de la alfalfa y su bajo contenido de azúcares solubles. Se empleó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos: T1 (100% maíz), T2 (5% alfalfa), T3 (10% alfalfa) y T4 (15% alfalfa), con cinco repeticiones. Los ensilajes se almacenaron durante 30 días. Se evaluaron aerobios mesófilos, mohos y levaduras, así como BAL iniciales y durante la cinética de fermentación. Además, se aplicaron pruebas bioquímicas (catalasa, amilasa, ureasa y tinción de Gram) y se cuantificaron metabolitos incluyendo ácido acético y etanol. Los resultados mostraron que los aerobios mesófilos alcanzaron 1,260 UFC/g en T4, mientras que mohos y levaduras fueron mayores en T1 (497.4 UFC/g). El ácido acético alcanzó 5.10 g/L en T3, mientras que el etanol fue máximo en T2 (2.10 g/L). La cinética presentó el pico en T2, con 7.11×10^8 UFC/mL a las 32 h, con fases logarítmicas más prolongadas a menores inclusiones de alfalfa; mientras que T4 mostró menor estabilidad fermentativa, probablemente por su capacidad tampón. En conjunto, incluir alfalfa hasta un 10% favorece BAL y la acidificación sin comprometer la estabilidad microbiológica, aportando criterios para optimizar ensilajes mixtos para rumiantes y sostenibilidad de los sistemas forrajeros.

Palabras clave: Bacterias ácido-lácticas; ensilaje mixto; fermentación anaeróbica; maíz; alfalfa; estabilidad microbiológica; ácido láctico

Abstract: The inclusion of legumes in silage mixtures provides nutritional benefits but presents a fermentation challenge due to alfalfa's high buffering capacity and low soluble sugar content. A completely randomized design with four treatments was used: T1 (100% corn), T2 (5% alfalfa), T3 (10% alfalfa), and T4 (15% alfalfa), with five replicates. The silages were stored for 30 days. Mesophilic aerobes, molds, and yeasts were evaluated, as well as initial and fermentation kinetics LAB. Biochemical tests (catalase, amylase, urease, and Gram staining) were also performed, and metabolites, including acetic acid and ethanol, were quantified. The results showed that mesophilic aerobes reached 1,260 CFU/g in T4, while molds and yeasts reached 418.6 CFU/g in the same treatment. Initial lactic acid bacteria (LAB) levels were highest in T1 (497.4 CFU/g). Acetic acid reached 5.10 g/L in T3, while ethanol was highest in T2 (2.10 g/L). Fermentation kinetics peaked in T2, with 7.11×10^8 CFU/mL at 32 h, exhibiting longer logarithmic phases at lower alfalfa inclusions. T4 showed lower fermentative stability, likely due to its buffering capacity. Overall, including alfalfa up to 10% promotes LAB and acidification without compromising microbiological stability, providing criteria for optimizing mixed silages for ruminants and the sustainability of forage systems.

Keywords: Lactic acid bacteria; mixed silage; anaerobic fermentation; maize; alfalfa; microbiological stability; lactic acid

1. Introducción

El ensilaje de maíz (*Zea mays*) se ha consolidado como una de las alternativas más utilizadas para la conservación de forrajes en sistemas de producción de rumiantes, debido a su alto rendimiento, elevada disponibilidad de carbohidratos solubles y adecuada digestibilidad, características que favorecen una fermentación eficiente y la obtención de silos de buena calidad (Shah *et al.*, 2025; Tuovinen *et al.*, 2025). No obstante, la necesidad de optimizar el perfil nutricional de las dietas, especialmente en términos de proteína y balance de nutrientes, ha impulsado el interés por el uso de ensilajes mixtos que incorporen leguminosas como la alfalfa (*Medicago sativa*), reconocida por su alto contenido proteico y su aporte de minerales, lo cual puede mejorar el desempeño productivo y el aprovechamiento del forraje en rumiantes (Niyigena *et al.*, 2024).

A pesar de sus ventajas nutricionales, la alfalfa presenta limitaciones tecnológicas relevantes para el proceso de ensilaje. Su menor concentración de azúcares fermentables y su alta capacidad tampón pueden retrasar la disminución del pH durante las primeras etapas de fermentación, favoreciendo el crecimiento de microorganismos indeseables y comprometiendo la estabilidad aeróbica del silo (Silva *et al.*, 2025). En este contexto, las bacterias ácido lácticas (BAL) desempeñan un rol determinante al transformar los carbohidratos solubles en ácido láctico y otros metabolitos, promoviendo la acidificación del medio y la estabilización anaeróbica del ensilaje (Okoye *et al.*, 2023). La dinámica poblacional de las BAL, así como la evolución de comunidades microbianas como aerobios mesófilos, mohos y levaduras, está influenciada por el sustrato disponible y por la proporción de leguminosa incluida en la mezcla (Yan *et al.*, 2022).

Diversos estudios han señalado que la inclusión moderada de leguminosas puede favorecer el valor nutritivo del ensilaje; sin embargo, sus efectos sobre la cinética fermentativa y la estabilidad microbiológica no son consistentes, debido a variaciones en el nivel de inclusión, las condiciones de ensilado y la composición inicial del forraje (Li *et al.*, 2023). En particular, existe información limitada sobre cómo niveles crecientes de alfalfa entre 5% y 15% modifican la dinámica temprana de BAL durante las primeras 48 horas, fase crítica en la que se define la velocidad de acidificación y la dominancia microbiana del proceso fermentativo (Liu *et al.*, 2018).

Por último, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar el microbiota de ensilajes de maíz con inclusiones crecientes de alfalfa (5, 10, 15%), con énfasis en la dinámica poblacional de las bacterias ácido lácticas durante las primeras etapas de fermentación y su relación con la producción de metabolitos claves como ácido acético y etanol. Los resultados aportarán

información valiosa para optimizar las estrategias de conservación de forrajes, reduciendo pérdidas, mejorando la calidad nutritiva y contribuyendo a la sostenibilidad de los sistemas ganaderos

2. Materiales y Métodos

Lugar de investigación

La investigación se desarrolló en el Campus "La María", en el Laboratorio de Biología y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo en la provincia de Los Ríos, Cantón Mocache, Ecuador.

Manejo específico del experimento

El maíz forrajero se obtuvo de una parcela establecida en el Campus Experimental "La María". Se realizó un corte de igualación a los 85 días, no se realizó fertilización ni riego. La Alfalfa se obtuvo del mercado del cantón Quevedo, provincia de Los Ríos.

Se prepararon cuatro silos de maíz forrajero por tratamiento con inclusiones de alfalfa: Para ello, se emplearon 20 silos experimentales (con cinco réplicas por tratamiento), cada uno con una capacidad de almacenamiento de 40 kg. El forraje se cosecho en su punto óptimo de madurez a los 85 días. Tanto el maíz forrajero como la alfalfa se picaron a un tamaño de partícula aproximado de 2 cm, utilizando una picadora de pasto (Trapp® ES 400, Brasil), por último, se ensiló utilizando una máquina ensiladora (Silopack J402). Los silos se sellaron herméticamente y fueron almacenados a temperatura ambiente ($26 \pm 0,6$ °C), evitando la exposición directa a la radiación solar. Los silos se abrieron después de 30 días de almacenamiento.

En este estudio no se utilizó animales. Todas las muestras se manipularon bajo condiciones estériles para prevenir contaminaciones cruzadas y asegurar la repetibilidad de los resultados.

Tratamientos evaluados

Los datos fueron registrados y tabulados utilizando hojas de Excel para su correcta organización y procesamiento. Posteriormente, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software SAS, permitiendo evaluar la variabilidad de los resultados. Para determinar las diferencias significativas entre las medias, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey, los resultados se presentan en la Tabla 1

Tabla 1. Descripción de los tratamientos

Tratamientos	Descripción del tratamiento	Repeticiones
T1	100% ensilaje de maíz	5
T2	95% ensilaje de maíz + 5% Alfalfa	5
T3	90% ensilaje de maíz + 10% Alfalfa	5
T4	85% ensilaje de maíz + 15% Alfalfa	5

Variables evaluadas

Aislamiento y recuento de colonias

Inicialmente, se pesó 1,0 g de cada muestra de ensilaje, la cual fue colocada en un mortero estéril, añadiendo 90 mL de agua destilada. Las muestras fueron trituradas manualmente hasta lograr una suspensión homogénea. Posteriormente, se preparó una dilución seriada 10^{-4} , transfiriendo 100 μ L de la suspensión macerada a un tubo de microcentrífuga que contenía previamente 900 μ L de agua destilada estéril, logrando un volumen final de 1 ml.

Siguiendo la metodología descrita por De MAN *et al.*, (1960), se elaboraron tres tipos de medios de cultivo: uno específico para bacterias ácido lácticas, otro para aerobios mesófilos, y un tercero para mohos y levaduras. Cada medio fue preparado en matraces de 1000 mL hasta un volumen final de 600 mL. La esterilización se efectuó mediante autoclave a 121°C durante 40 minutos.

Simultáneamente, se esterilizaron 120 placas Petri vacías. Posteriormente, bajo condiciones de flujo laminar, se expusieron las placas, micropipetas, puntas estériles, asas de siembra de vidrio y un mechero de seguridad a radiación ultravioleta (UV) durante 15 minutos. Posteriormente, se distribuyó en las 120 placas el agar correspondiente, una vez solidificados los medios de cultivo en las placas, se realizó una segunda exposición UV de 15 minutos para garantizar la esterilidad superficial.

De acuerdo con el procedimiento descrito por Miles y Misra (1938), en condiciones de asepsia, se inocularon 10 µL de la dilución seriada 10^{-4} sobre la superficie de cada placa, utilizando micropipetas y distribuyendo de forma homogénea con un asa de siembra estéril. Se sembraron 40 placas para cada tipo de medio. Las placas sembradas fueron cubiertas individualmente en fundas de polietileno (polifan) para evitar la contaminación cruzada y se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas en estufa microbiológica.

Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a la enumeración de las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante un contador de colonias digital. Los resultados obtenidos se expresaron como UFC por gramo de muestra, considerando el factor de dilución empleado.

Caracterización microscópica apoyada en análisis bioquímicos

A partir de las placas de cultivo, se seleccionaron 24 placas de referencia, eligiéndose dos colonias morfológicamente representativas por placa, obteniendo un total de 48 cepas para realizar las pruebas bioquímicas.

Tinción de Gram

Siguiendo el procedimiento propuesto por Has Paray *et al.*, (2023), se procedió a caracterizar cada colonia mediante tinción de Gram. Para ello, se realizó un frotis a cada colonia previamente identificada, depositando en un portaobjeto, utilizando una pequeña cantidad de cada colonia homogeneizada en agua destilada estéril. Los frotis fueron fijados por flameado suave y teñidos secuencialmente con cristal violeta (30 s), yodogram (30 s), alcohol cetona (30 s) y safranina (40 s), con enjuagues intermedios de agua corriente entre cada reactivo.

Finalmente, la observación se realizó utilizando un microscopio con objetivo de inmersión (100X), permitiendo distinguir bacterias Gram positivas (coloración azul/violeta) de Gram negativas (rosado/rojo).

Prueba de Catalasa

Para evaluar la actividad catalasa, se colocó una pequeña cantidad de la colonia en un portaobjetos, luego se añadió una gota de agua oxigenada y se observó la reacción. La producción inmediata de burbujas gaseosas se interpretó como prueba positiva, mientras que su ausencia como prueba negativa, siguiendo lo establecido por Mahmoud *et al.*, (2024).

Prueba de Ureasa

La prueba de ureasa se realizó utilizando un medio compuesto por agar (7,5 g), cloruro de sodio (5 g), dextrosa (1 g), fosfato dipotásico (20 g), peptona especial (1 g), urea (10 g) y rojo de metil como indicador, todo diluido en 1000 mL de agua destilada, siguiendo el protocolo clásico descrito por Christensen (1946). La mezcla fue esterilizada a 121 °C en autoclave y, aún tibia, se distribuyó en 48 tubos de ensayo estériles bajo condiciones asépticas, de acuerdo con el protocolo descrito por Christensen (1946).

Para la inoculación, se preparó una suspensión bacteriana en microcentrifugas con 10 µL de agua destilada y una pequeña porción de cada colonia seleccionada. Esta suspensión se

transfirió a los tubos con el medio solidificado. Los tubos fueron incubados a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Inicialmente, el medio presentaba un color rojo intenso, característico de un ambiente ácido o neutro. Sin embargo, cuando la ureasa estuvo activa, la hidrólisis de la urea liberó amoníaco, elevando el pH y provocando que el indicador cambiara su color a amarillo. Por consiguiente, un cambio a amarillo se interpretó como un resultado positivo para la actividad ureásica, mientras que la ausencia de cambio, manteniendo el color rojo intenso, indicó un resultado negativo, reflejando la falta de dicha actividad en la muestra analizada.

Prueba de Amilasa

La prueba de actividad amilásica se realizó siguiendo la metodología clásica desarrollada por Huggins y Russell (1948), la cual fue adaptada para este estudio. Para ello, se preparó un medio de cultivo compuesto por almidón (10 g), peptona especial (5 g), extracto de levadura (3 g), agar (15 g) y bromofenol como indicador de pH, disueltos en 1000 mL de agua destilada, obteniendo una solución de color verde. Esta mezcla fue esterilizada en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y utilizada para preparar 12 placas de agar.

Cada placa fue dividida en cuatro sectores, permitiendo la inoculación de una colonia por sección. En total, se sembraron 48 colonias distribuidas en las 12 placas. Antes y después de agregar la solución, las placas fueron expuestas a radiación ultravioleta (UV) para controlar la contaminación y asegurar condiciones estériles. Para la siembra, se utilizó una asa plástica para tomar cada colonia, realizando movimientos en zigzag desde la periferia hacia el centro de cada sección, asegurando una distribución homogénea del inóculo.

Tras la incubación, la actividad amilásica se evaluó observando cambios en la coloración del medio. Se identificaron zonas decoloradas amarillas alrededor de las colonias con actividad enzimática, contrastando con áreas de color turquesa o azul en sectores sin actividad. La decoloración indica la hidrólisis del almidón por la amilasa, mientras que las zonas teñidas indican ausencia de dicha actividad.

Determinación de ácido acético

Para la determinación de ácido acético producido por las bacterias, se empleó un método volumétrico de titulación ácido-base, como lo describió Berasarte *et al.*, (1976). Inicialmente, las muestras de cultivo fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos para eliminar las células y partículas sólidas. El sobrenadante obtenido fue filtrado a través de un filtro de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ para asegurar la clarificación de la muestra. Posteriormente, se pipetearon 25 mL de cada sobrenadante en matraces Erlenmeyer y se adicionaron 2-3 gotas de fenolftaleína como indicador de pH.

La titulación se llevó a cabo agregando gota a gota una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, bajo agitación constante, hasta observar un cambio de color estable a rosa, indicativo del punto final de la titulación (pH ~ 8.3). El volumen de NaOH consumido fue registrado para cada muestra. Para calcular la concentración de ácido acético en las muestras, se aplicó la relación estequiométrica entre el volumen y la normalidad de NaOH y el volumen de la muestra titulada, ajustando posteriormente a gramos por litro considerando el peso molecular del ácido acético. Como control, se realizó la misma titulación sobre el medio de cultivo no inoculado para corregir la acidez basal.

Cuantificación de alcohol

En cuanto a la cuantificación de alcohol (etanol) producido por las bacterias, se utilizó un método enzimático basado en un kit comercial. De igual forma, las muestras de cultivo fueron centrifugadas y filtradas para obtener un sobrenadante libre de células y partículas. Siguiendo las instrucciones del fabricante del kit, se prepararon las soluciones enzimáticas y tampones requeridos. En cubetas para espectrofotometría se mezclaron volúmenes determinados del

sobrenadante con los reactivos del kit, incubándose la mezcla durante el tiempo y temperatura especificados (generalmente entre 5 y 10 minutos a temperatura ambiente o 37 °C).

La absorbancia resultante se midió a 340 nm, correspondiente a la formación de NADH durante la reacción catalizada por el alcohol deshidrogenasa. Para la cuantificación, se elaboró una curva de calibración con estándares de etanol de concentración conocida, que permitió interpolar la concentración de etanol presente en las muestras analizadas. Se realizaron controles en blanco y las mediciones fueron realizadas por duplicado para garantizar la precisión y reproducibilidad de los resultados, siguiendo el protocolo descrito por (Ivory *et al.*, 2021).

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de los recuentos bacterianos fueron analizados mediante estadística descriptiva, como medias y desviaciones estándar. Para la comparación de los distintos tratamientos de ensilaje y las diferencias entre los momentos de muestreo, se empleó un análisis de varianza (ADEVA). En caso de diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$). Además, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la cantidad de bacterias ácido lácticas, con el fin de determinar cómo estos parámetros influyen en la calidad y estabilidad del ensilaje.

3. Resultados

Reencuentro microbiano por tratamiento (T1-T4).

Numero de colonias aerobios mesófilos

Se observaron diferencias significativas entre tratamientos en los tres grupos microbianos evaluados. Los aerobios mesófilos fueron más altos en T4 (15% Alfalfa) con un promedio de (~1260 UFC/g) colonias por placa, superando a T1, T2 y T3 (257, 289 y 435 UFC/g), lo que es consistente con la mayor capacidad tampón de la alfalfa y su impacto en la estabilidad aeróbica.

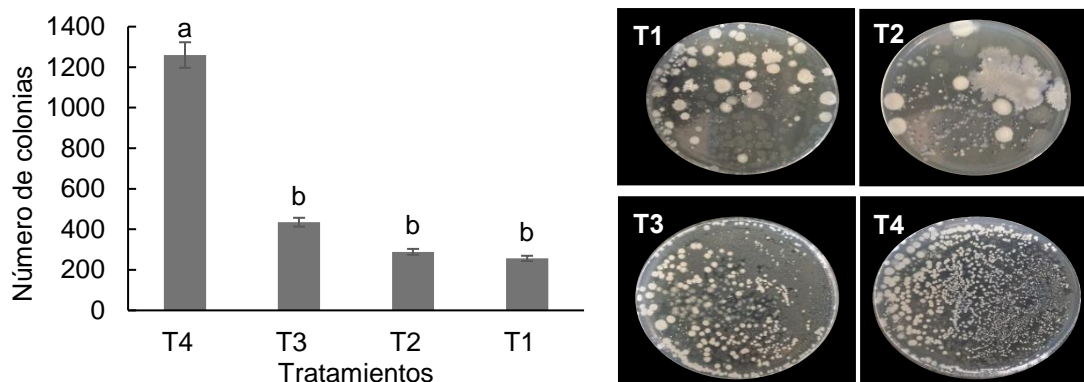


Figura 1. Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g) con diferentes inclusiones de alfalfa: T1 (100% maíz), T2 (5% alfalfa), T3 (10% alfalfa) y T4 (15% alfalfa). Las barras representan la media \pm EE ($n = 5$). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Numero de colonias mohos y levaduras

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el recuento de mohos y levaduras entre tratamientos. El tratamiento T4 (15% alfalfa) presentó el valor más alto (~418,6 UFC/g), significativamente superior a T3 (10% alfalfa, ~74,4 UFC/g). Los tratamientos T1 (100% maíz) y T2 (5% alfalfa) mostraron valores intermedios (~273,5 y 186 UFC/g).

El análisis de Tukey indicó que T4 y T1-T2 se agruparon estadísticamente, diferenciándose de T3. Estos resultados sugieren que la inclusión de alfalfa influye en niveles elevados promueve la proliferación fúngica, posiblemente a cambios en la disponibilidad de sustratos fermentables o en las condiciones microambientales del ensilaje.

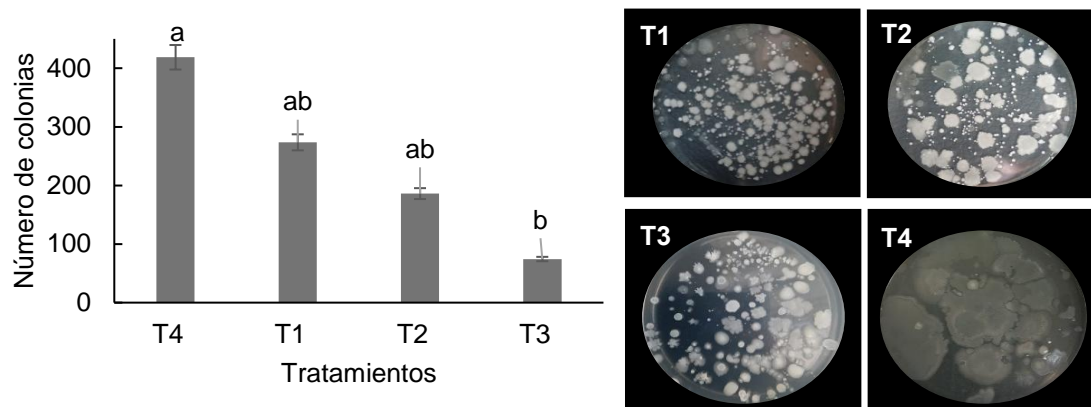


Figura 2. Recuento de mohos y levaduras (UFC/g) con diferentes inclusiones de alfalfa: T1 (100% maíz), T2 (5% alfalfa), T3 (10% alfalfa) y T4 (15% alfalfa). Las barras representan la media ± EE (n = 5). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Numero de bacterias ácido lácticas

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el número de colonias de bacterias ácido lácticas entre los tratamientos. El tratamiento T1 (100% maíz) presentó el mayor valor (~497,4 UFC/g), significativamente superior al T2 (5% alfalfa, ~97,4 UFC/g). Los tratamientos T3 (10% alfalfa) y T4 (15% alfalfa) mostraron valores intermedios (~3.56 y 3.92 UFC/g).

El análisis de Tukey evidenció que T3 y T4 no difirieron estadísticamente de T1 ni de T2, situándose en un grupo intermedio. Estos resultados sugieren que la adición de alfalfa modifica de manera no lineal la proliferación de BAL, posiblemente debido a la menor disponibilidad de carbohidratos solubles y al mayor efecto tampón de la proteína de la alfalfa, lo cual afecta las condiciones de fermentación del ensilaje

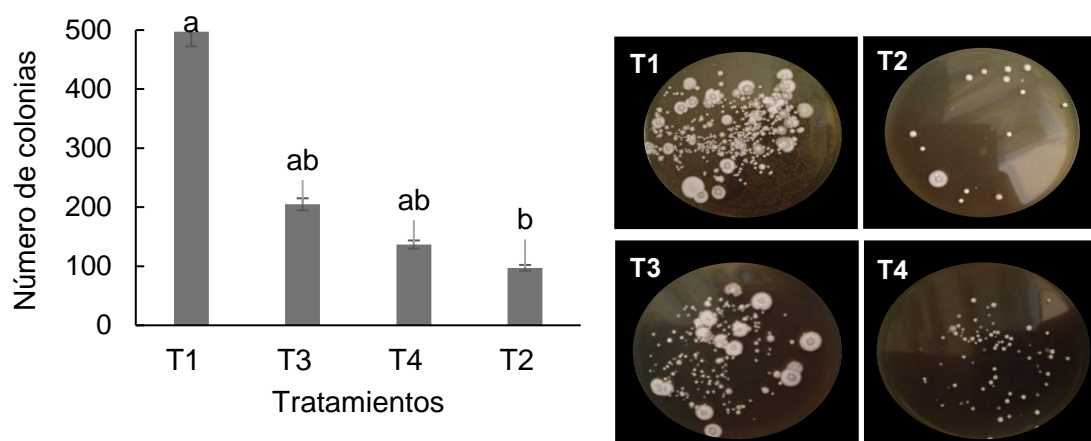


Figura 3. Recuento de bacterias ácido lácticas (UFC/g) con diferentes inclusiones de alfalfa: T1 (100% maíz), T2 (5% alfalfa), T3 (10% alfalfa) y T4 (15% alfalfa). Las barras representan la media ± EE (n = 5). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Pruebas bioquímicas de bacterias asociadas al ensilaje

Aerobios mesófilos

Las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas bacterianas aisladas (NDs-1 a NDs-16) evidenciaron una amplia variabilidad en sus perfiles enzimáticos. La actividad ureásica fue

predominante, con reacciones positivas en la mayoría de las cepas, destacando NDs-14 con una reacción altamente positiva (++), lo que sugiere un papel potencial en el metabolismo del nitrógeno en el ensilaje.

Todas las cepas resultaron catalasas positivas, lo que indica su capacidad de tolerar condiciones con presencia de oxígeno. En cuanto a la producción de amilasa, esta fue observada en la mayoría de las cepas a partir de NDs-5, lo cual podría contribuir a la degradación de almidón y disponibilidad de azúcares fermentables.

La tinción de Gram mostró resultados negativos en todas las cepas, hecho que contrasta con la naturaleza Gram-positiva típica de las BAL, lo que sugiere la posible presencia de otras bacterias no pertenecientes al grupo Lactobacillus. Este hallazgo requiere de confirmación adicional mediante pruebas moleculares.

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a cepas bacterianas aisladas de ensilaje. Se evaluaron las actividades de ureasa, catalasa, amilasa y la tinción de Gram en las cepas NDs-1 a NDs-16. Los signos "+" indican una reacción positiva, mientras que los signos "-" indican una reacción negativa, y "++" denota una alta reacción.

TRATAMIENTO	Cepa	Ureasa	Catalasa	Amilasa	Tinción De Gram
T1R4	NDs-1	-	+	-	-
	NDs-2	+	+	-	-
T1R5	NDs-3	+	+	-	-
	NDs-4	+	+	-	-
T2R3	NDs-5	+	+	+	-
	NDs-6	+	+	+	-
T2R4	NDs-7	+	+	+	-
	NDs-8	+	+	+	-
T3R2	NDs-9	+	+	+	-
	NDs-10	+	+	+	-
T3R4	NDs-11	+	+	+	-
	NDs-12	+	+	+	-
T4R4	NDs-13	+	+	+	-
	NDs-14	++	+	+	-
T4R5	NDs-15	-	+	+	-
	NDs-16	+	+	+	-

Mohos y Levaduras

Las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de mohos y levaduras aisladas del ensilaje (PDs-1 a PDs-16) mostraron una variabilidad enzimática moderada. La actividad ureásica fue positiva en casi todas las cepas, excepto en PDs-4, que presentó una reacción negativa, lo que indica una alta capacidad para hidrolizar urea y participar en el metabolismo del nitrógeno.

Todas las cepas resultaron catalasas positivas, reflejando tolerancia a condiciones aeróbicas. La producción de amilasa fue universalmente positiva en todas las cepas, lo cual representa un potencial beneficio en la degradación del almidón y la disponibilidad de carbohidratos fermentables en el ensilaje.

Respecto a la tinción de Gram, la mayoría de las cepas fueron Gram-positivas, aunque PDs-3, PDs-11 y PDs-12 se presentaron Gram-negativas. Estas diferencias reflejan variaciones en la estructura de la pared celular de los mohos y levaduras, sin constituir un criterio taxonómico definitivo, lo que sugiere diferencias estructurales en la pared celular entre los aislados.

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a cepas bacterianas aisladas de ensilaje. Se evaluaron las actividades de ureasa, catalasa, amilasa y la tinción de Gram en las cepas PDs-1 a PDs-16. Los signos "+" indican una reacción positiva, mientras que los signos "-" indican una reacción negativa, y "++" denota una alta reacción.

TRATAMIENTO	Cepa	Ureasa	Catalasa	Amilasa	Tinción De Gram
T1R4	PDs-1	+	+	+	+
	PDs-2	+	+	+	+
T1R5	PDs-3	+	+	+	-
	PDs-4	-	+	+	+
T2R3	PDs-5	+	+	+	+
	PDs-6	+	+	+	+
T2R4	PDs-7	+	+	+	+
	PDs-8	+	+	+	+
T3R2	PDs-9	+	+	+	+
	PDs-10	+	+	+	+
T3R4	PDs-11	+	+	+	-
	PDs-12	+	+	+	-
T4R4	PDs-13	+	+	+	+
	PDs-14	+	+	+	+
T4R5	PDs-15	+	+	+	+
	PDs-16	+	+	+	+

Bacterias Ácido Lácticas

Las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas LDs-1 a LDs-16 evidenciaron una marcada variabilidad metabólica. En cuanto a la actividad ureásica, la mayoría de las cepas presentaron reacciones positivas, destacando LDs-8, LDs-11 y LDs-14 con una reacción intensamente positiva (++) , lo que indica una mayor capacidad para participar en el metabolismo del nitrógeno.

La actividad catalasa fue positiva en la mayoría de las cepas, reflejando su habilidad de tolerar ambientes con oxígeno; sin embargo, LDs-9, LDs-10 y LDs-11, resultaron negativas, lo que podría limitarlas en condiciones de estrés oxidativo. La producción de amilasa fue universalmente positiva en todas las cepas, lo cual representa un potencial beneficio en la degradación del almidón y la disponibilidad de carbohidratos fermentables en el ensilaje. Finalmente, la tinción de Gram reveló que la mayoría de las cepas fueron Gram-positivas, como es característico de las bacterias ácido lácticas, aunque LDs-7 y LDs-11 se presentaron Gram-negativas. Esta diversidad refleja la heterogeneidad microbiana presente en el ensilaje y sugiere la coexistencia de cepas con distintos mecanismos de adaptación, con implicaciones directas en la fermentación y la conservación del forraje.

Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a cepas bacterianas aisladas de ensilaje. Se evaluaron las actividades de ureasa, catalasa, amilasa y la tinción de Gram en las cepas LDs-1 a LDs-16. Los signos "+" indican una reacción positiva, mientras que los signos "-" indican una reacción negativa, y "++" denota una alta reacción.

TRATAMIENTO	Cepa	Ureasa	Catalasa	Amilasa	Tinción De Gram
T1R4	LDs-1	+	+	+	+
	LDs-2	+	+	+	+
T1R5	LDs-3	+	+	+	+
	LDs-4	+	+	+	+
T2R3	LDs-5	+	+	+	+

	LDs-6	+	+	+	+
T2R4	LDs-7	+	+	+	-
	LDs-8	++	+	+	+
T3R2	LDs-9	+	-	+	+
	LDs-10	+	-	+	+
T3R4	LDs-11	++	-	+	-
	LDs-12	+	+	+	+
T4R4	LDs-13	+	+	+	+
	LDs-14	++	+	+	+
T4R5	LDs-15	+	+	+	+
	LDs-16	+	+	+	+

Producción de ácido acético y etanol por bacterias ácido lácticas

La producción de metabolitos fermentativos por las cepas bacterianas evaluadas evidenció diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto en ácido acético como en etanol (Tabla 5). La cepa T3 se destacó como la mayor productora de ácido acético (5.10 ± 0.15 g/L), mientras que la cepa T2 registró la mayor concentración de etanol (2.10 ± 0.05 g/L). Los tratamientos T1 y T4 presentaron valores intermedios y comparables en ambos metabolitos, sin diferencias significativas entre sí.

De manera interesante, T3, a pesar de alcanzar el mayor contenido de ácido acético, mostró la menor producción de etanol (1.20 ± 0.06 g/L), lo que sugiere un metabolismo orientado hacia rutas heterofermentativas más estables. En contraste, T2 exhibió un perfil de fermentación alcohólica más marcado.

Estos hallazgos tienen implicaciones directas para la calidad del ensilaje: concentraciones elevadas de ácido acético contribuyen a mejorar la estabilidad aeróbica al inhibir levaduras y mohos, mientras que una producción excesiva de etanol puede reflejar pérdidas energéticas indeseadas. Por lo tanto, las diferencias metabólicas observadas sugieren que la selección de cepas específicas podría optimizar procesos de conservación forrajera y, eventualmente, aplicaciones biotecnológicas en inoculantes destinados a ensilajes con diferentes composiciones.

Tabla 5. Producción de ácido acético y etanol (g/L) por diferentes cepas bacterianas (T1, T2, T3 y T4).

Cepa Bacteriana	Ácido Acético (g/L)	Etanol (g/L)
T1	4.25 ± 0.12^b	1.75 ± 0.08^b
T2	3.80 ± 0.10^c	2.10 ± 0.05^a
T3	5.10 ± 0.15^a	1.20 ± 0.06^c
T4	4.18 ± 0.18^b	1.86 ± 0.18^b

Nota. Los valores representan la media \pm desviación estándar de triplicados. Letras diferentes en superíndice indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey.

Cinética de crecimiento de la población microbiana

Al integrar los resultados de los cuatro tratamientos, se observan diferencias claras en la dinámica poblacional de las BAL. El ensilaje con 5% de alfalfa (T2) alcanzó el mayor pico de crecimiento ($7,11 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹ a las 32 h), superando significativamente a los demás tratamientos, lo que sugiere que esta proporción generó condiciones óptimas para la proliferación bacteriana. En contraste, el tratamiento con 15% de alfalfa (T4) presentó el pico más bajo ($4,17 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹), confirmando que una elevada capacidad tampón limita la acidificación inicial y restringe el crecimiento de BAL.

El tratamiento T1 (100% maíz) mostró un crecimiento inicial más alto ($2,16 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹), pero con un declive más temprano, mientras que T3 (10% alfalfa) se mantuvo en un nivel intermedio en todo el proceso. Estos resultados refuerzan la idea de que la inclusión moderada de alfalfa favorece una fermentación más eficiente, mientras que su exceso compromete la dominancia de las BAL y, por ende, la calidad fermentativa del ensilaje.

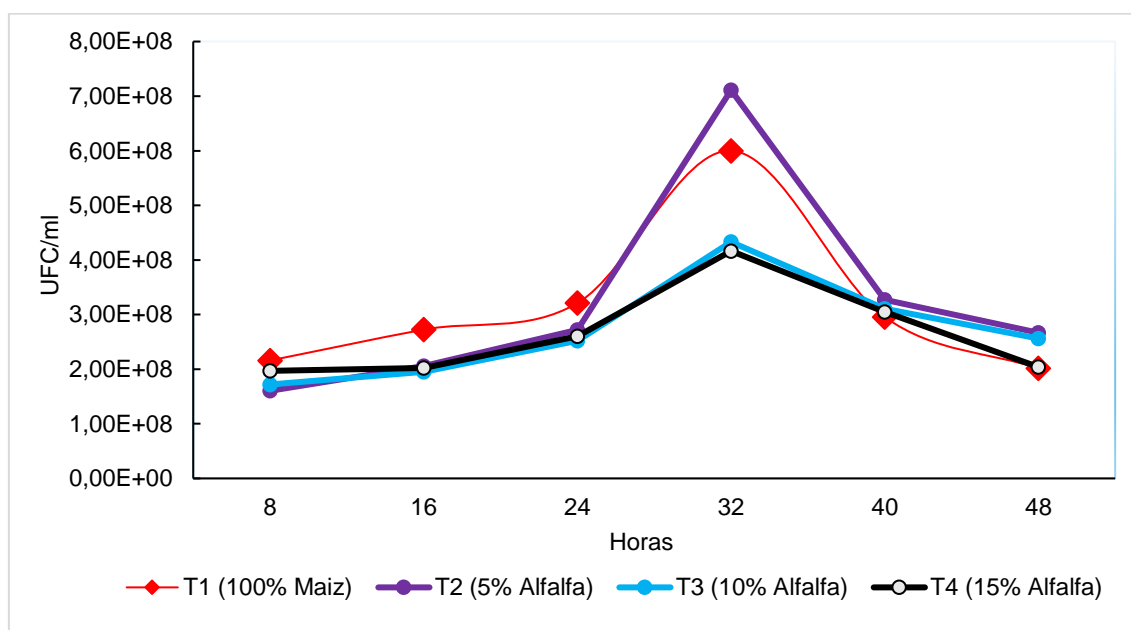


Figura 4. Cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) durante 8 a 48 horas de incubación en ensilajes con diferentes niveles de inclusión de alfalfa: T1 (100% maíz), T2 (5% alfalfa), T3 (10% alfalfa) y T4 (15% alfalfa).

4. Discusión

El incremento significativo de los aerobios mesófilos observado se origina a partir de la interacción entre las propiedades fisicoquímicas del sustrato y la dinámica microbiana del proceso de ensilaje. La alfalfa, a diferencia del maíz, presenta una elevada capacidad tampón atribuida a su alto contenido de proteínas, aminoácidos y sales minerales, lo cual reduce la velocidad de acidificación inicial del medio (Li *et al.*, 2023). Este efecto amortiguador impide una rápida disminución del pH durante las primeras fases de la fermentación, manteniendo valores cercanos a la neutralidad por un periodo prolongado. Bajo estas condiciones, los microorganismos aerobios mesófilos encuentran un ambiente favorable para su proliferación, dado que su crecimiento óptimo ocurre en rangos de pH entre 6.0 y 7.0, a diferencia de las bacterias ácido lácticas que dominan en ambientes más ácidos (Wang *et al.*, 2021).

Adicionalmente, la menor concentración de carbohidratos solubles fermentables en la alfalfa limita la disponibilidad de sustratos energéticos para las bacterias ácido lácticas, reduciendo su capacidad competitiva en las etapas tempranas del ensilaje (Bisson *et al.*, 2023). Este déficit energético retrasa la transición hacia una fermentación láctica eficiente, caracterizada por la rápida producción de ácido láctico y la consecuente inhibición de microorganismos indeseables (Fabiszewska *et al.*, 2019). En consecuencia, se genera una ventana ecológica en la cual los

aerobios mesófilos y otros microorganismos facultativos pueden multiplicarse activamente antes de que se establezcan condiciones anaeróbicas estrictas y de bajo pH (Socas-Rodríguez *et al.*, 2021).

Por otra parte, el elevado contenido de nitrógeno no estructural presente en la alfalfa favorece el desarrollo de comunidades microbianas heterótrofas no lácticas, muchas de las cuales poseen metabolismo aerobio o facultativo (Gomes *et al.*, 2021). Estos microorganismos pueden utilizar aminoácidos y compuestos nitrogenados como fuentes de carbono y energía, incrementando su densidad poblacional en ausencia de una presión selectiva ejercida por ácidos orgánicos (Li *et al.*, 2023). Este fenómeno se ve reforzado por la posible acumulación de productos intermedios de degradación proteica, como amonio, que contribuyen a mantener el pH elevado y perpetuar condiciones favorables para microbiota no deseada (Xu *et al.*, 2022).

La mayor abundancia de bacterias ácido lácticas (BAL) observada está ligado fundamentalmente a la alta disponibilidad de carbohidratos solubles presentes en este forraje, los cuales constituyen el principal sustrato energético para el metabolismo fermentativo de estos microorganismos (Guo *et al.*, 2023). El maíz, rico en azúcares fácilmente fermentables como glucosa, fructosa y sacarosa, favorece una rápida activación metabólica de las BAL, permitiendo su crecimiento exponencial en las primeras etapas del ensilaje (Navarro *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021). Este proceso conduce a una producción acelerada de ácido láctico, lo que reduce rápidamente el pH y genera un ambiente altamente selectivo que inhibe microorganismos competidores, consolidando así la dominancia de las BAL (Pazos-Rojas *et al.*, 2023).

En contraste, la inclusión de alfalfa en los tratamientos introduce limitaciones bioquímicas y fisiológicas que afectan negativamente la proliferación de las BAL (Gao *et al.*, 2021). La alfalfa presenta una menor concentración de carbohidratos solubles y una mayor proporción de fibra estructural, lo que reduce la disponibilidad inmediata de sustratos fermentables. Esta restricción energética limita la tasa de crecimiento específico de las BAL, afectando su capacidad para establecerse rápidamente como microbiota dominante (Zhao *et al.*, 2025). Como resultado, se observa una disminución significativa en el recuento de BAL que tiene una tendencia a valores aún más bajos, evidenciando una respuesta dependiente de la proporción de leguminosa incorporada (Tatli Seven *et al.*, 2021).

Adicionalmente, el elevado contenido proteico de la alfalfa confiere una alta capacidad tampón al sistema, lo que interfiere con la cinética de acidificación del ensilaje (Lewis *et al.*, 2022). La resistencia a la disminución del pH prolonga un entorno subóptimo para el crecimiento de las BAL, ya que estas bacterias alcanzan su máxima eficiencia metabólica en condiciones ligeramente ácidas (Guo *et al.*, 2023). La persistencia de valores de pH más elevados durante las fases iniciales favorece la competencia con otros grupos microbianos, reduciendo la eficiencia ecológica de las BAL y limitando su expansión poblacional (Ghaffari *et al.*, 2019).

La comunidad microbiana evidencia una notable plasticidad metabólica, la cual puede interpretarse como una estrategia adaptativa frente a las condiciones fluctuantes del ensilaje. La predominancia de actividad ureásica en la mayoría de las cepas sugiere una activa participación en el metabolismo del nitrógeno, específicamente mediante la hidrólisis de urea a amoníaco, lo que contribuye al incremento del pH del medio (Turner *et al.*, 2019). Este fenómeno es particularmente relevante en sistemas con alta inclusión de alfalfa, donde la acumulación de compuestos nitrogenados y la capacidad tampón favorecen la persistencia de condiciones subóptimas para la acidificación, facilitando así la proliferación de microbiota no láctica (Nascimento *et al.*, 2023).

La actividad catalasa positiva en todas las cepas indica una elevada tolerancia al estrés oxidativo, lo que sugiere que estos microorganismos poseen mecanismos eficientes para detoxificar especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (Stratton *et al.*, 2022). Esta característica es consistente con su naturaleza aerobia o facultativa, permitiéndoles mantenerse metabólicamente activos durante las fases iniciales del ensilaje, cuando aún existe oxígeno residual (Warzée *et al.*, 2021). En este contexto, la presencia de catalasa representa una ventaja competitiva frente a bacterias estrictamente anaerobias, como muchas BAL, las cuales carecen de este sistema enzimático (Ariete *et al.*, 2021).

En relación con la actividad amilásica, su presencia en la mayoría de las cepas sugiere una capacidad funcional para hidrolizar polisacáridos complejos, como el almidón, generando azúcares fermentables que pueden ser utilizados tanto por estas bacterias como por otros

microorganismos presentes en el sistema (Cheng *et al.*, 2020). Este proceso puede alterar la dinámica de disponibilidad de sustratos en el ensilaje, favoreciendo la proliferación de comunidades microbianas no deseadas y generando competencia directa con las bacterias ácido lácticas por recursos energéticos limitados (Górecki *et al.*, 2021).

Por otra parte, la tinción de Gram negativa observada en todas las cepas analizadas contrasta con el perfil clásico de las bacterias ácido lácticas, que son típicamente Gram-positivas (Sorrentino *et al.*, 2023). Este resultado sugiere que los microorganismos aislados corresponden a grupos bacterianos distintos, posiblemente pertenecientes a géneros aerobios o facultativos como Enterobacteriaceae u otros bacilos Gram-negativos asociados a procesos de deterioro (Dauplain *et al.*, 2020). Esta composición microbiana indica una desviación del perfil fermentativo ideal, donde las BAL deberían predominar, y pone en evidencia la influencia del sustrato y las condiciones fisicoquímicas en la selección microbiana (Jaspers *et al.*, 2020).

En el caso de los mohos y levaduras, la alta frecuencia de actividad ureásica y catalasa positiva refleja una notable capacidad de adaptación a condiciones aeróbicas y a ambientes con disponibilidad de nitrógeno (Wang *et al.*, 2020). La producción universal de amilasa en estas cepas sugiere un rol activo en la degradación de compuestos estructurales, lo que puede incrementar la disponibilidad de azúcares simples, pero también favorecer procesos de deterioro secundario (Xu *et al.*, 2022). La variabilidad observada en la tinción de Gram, aunque no es un criterio taxonómico determinante para estos microorganismos, indica heterogeneidad estructural en sus paredes celulares, lo que podría estar asociado a diferencias en resistencia ambiental y actividad metabólica (Martins *et al.*, 2021).

5. Conclusiones

La caracterización microbiana evidenció mayores recuentos de bacterias ácido lácticas en T1 (100 % maíz), T2 (5 % alfalfa) y T3 (10 % alfalfa), asociados con una fermentación más eficiente y mayor estabilidad del ensilaje. Por el contrario, T4 (15 % alfalfa) presentó predominio de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, lo que indica menor estabilidad aeróbica. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, dado que al menos uno de los niveles de inclusión de alfalfa (5 %, 10 % o 15 %) produjo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la composición microbiana.

La dinámica poblacional mostró que inclusiones de alfalfa ≤ 10 % (T2 y T3) promovieron un crecimiento logarítmico más eficiente de las bacterias ácido lácticas y mantuvieron un perfil microbiano equilibrado, mejorando la conservación del material ensilado. Sin embargo, T1 (100 % maíz) y T4 (15 % alfalfa) exhibieron menor dominancia de bacterias ácido lácticas y menor estabilidad fermentativa.

La producción de metabolitos evidenció que T3 (10 % alfalfa) registró la mayor concentración de ácido acético, favorable para la estabilidad aeróbica, mientras que T2 (5 % alfalfa) presentó la mayor producción de etanol. T1 (100 % maíz) y T4 (15 % alfalfa) mostraron valores intermedios. Por lo tanto, inclusiones moderadas de alfalfa entre 5 % y 10 % optimizan el equilibrio entre fermentación láctica, eficiencia energética y conservación del forraje.

Contribución de los autores: Conceptualización, DDGA y AVCM; metodología, DDGA, MACA y JEVN software, IFEG, CLNM; validación, DDGA y AVCM; análisis formal, DDGA; investigación, DDGA y AVCM; recursos, IFEG, CLNM y AVCM; redacción del borrador original, DDGA, MACA, redacción, revisión y edición, DDGA y AVCM; visualización, IFEG, JEVN; supervisión, AVCM.

Financiamiento: Esta investigación no ha recibido financiación externa

Agradecimientos: Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) por su apoyo invaluable durante el desarrollo de este estudio. Agradecemos a los docentes, investigadores y al personal administrativo por brindar los recursos necesarios, el acompañamiento y la infraestructura adecuada para llevar a cabo este trabajo. Su compromiso con la formación académica y la investigación ha sido fundamental para el éxito de este proyecto. Asimismo, extendemos nuestro reconocimiento a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de Ecuador por la beca otorgada, la cual ha contribuido significativamente al desarrollo de esta investigación.

Declaración de disponibilidad de datos: Los datos están disponibles previa solicitud a los autores de correspondencia: denise.quevara2016@uteq.edu.ec; acedenom@uteq.edu.ec

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias bibliográficas

- Ariete, V., Barnert, N., Gómez, M., Mieres, M., Pérez, B., & Gutierrez, JC (2021). Estudio morfométrico del segmento lumbar del plexo venoso vertebral interno en perros: Un estudio basado en tomografía computarizada con contraste. *Animals: An Open Access Journal From MDPI*, 11 (6), 1502. <https://doi.org/10.3390/ani11061502>
- Berasarte, I., Bordagaray, A., Garcia-Arrona, R., Ostra, M., Reis de Araujo, W., & Vidal, M. (2024). Microscale titration of acetic acid using digital colorimetry and paper-based analytical devices. *Talanta*, 276(126254), 126254. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126254>
- Bisson, G., Maifreni, M., Innocente, N., & Marino, M. (2023). Application of pre-adaptation strategies to improve the growth of probiotic lactobacilli under food-relevant stressful conditions. *Food & Function*, 14(4), 2128–2137. <https://doi.org/10.1039/d2fo03215e>
- Cheng, D., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Li, J., Ly, Q. V., Nguyen, T. A. H., & Tran, V. S. (2020). Applying a new pomelo peel derived biochar in microbial cell for enhancing sulfonamide antibiotics removal in swine wastewater. *Bioresource Technology*, 318(123886), 123886. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123886>
- Christensen, W. B. (1946). Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from salmonella and Shigella types. *Journal of Bacteriology*, 52(4), 461–466. <https://doi.org/10.1128/jb.52.4.461-466.1946>
- Dauplain, K., Trably, E., Santa-Catalina, G., Bernet, N., & Carrere, H. (2020). Role of indigenous bacteria in dark fermentation of organic substrates. *Bioresource Technology*, 313(123665), 123665. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123665>
- De MAN, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *The Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- Fabiszewska, A. U., Zielińska, K. J., & Wróbel, B. (2019). Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 35(5), 76. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2>
- Gao, R., Wang, B., Jia, T., Luo, Y., & Yu, Z. (2021). Effects of different carbohydrate sources on alfalfa silage quality at different ensiling days. *Agriculture*, 11(1), 58. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010058>
- Ghaffari, M. H., Jahanbekam, A., Sadri, H., Schuh, K., Dusel, G., Prehn, C., Adamski, J., Koch, C., & Sauerwein, H. (2019). Metabolomics meets machine learning: Longitudinal metabolite profiling in serum of normal versus overconditioned cows and pathway analysis. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11561–11585. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17114>
- Gomes, A. L. M., Bueno, A. V. I., Osmani, M. P., Machado, J., Nussio, L. G., Jobim, C. C., & Daniel, J. L. P. (2021). Effects of obligate heterofermentative lactic acid bacteria alone or in combination on the conservation of sugarcane silage. *Frontiers in Microbiology*, 12, 643879. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643879>
- Górecki, K., Rastogi, A., Stróżecki, M., Gąbka, M., Lamentowicz, M., Łuców, D., Kayzer, D., & Juszcak, R. (2021). Water table depth, experimental warming, and reduced precipitation impact on litter decomposition in a temperate Sphagnum-peatland. *The Science of the Total Environment*, 771(145452), 145452. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145452>

- 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>
- Huggins, C., & Russell, P. S. (1948). Colorimetric determination of amylase. *Annals of Surgery*, 128(4), 668–678. <https://doi.org/10.1097/0000658-194810000-00003>
- Ivory, R., Delaney, E., Mangan, D., & McCleary, B. V. (2021). Determination of ethanol concentration in Kombucha beverages: Single-laboratory validation of an enzymatic method, first action method 2019.08. *Journal of AOAC International*, 104(2), 422–430. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsa122>
- Jaspers, C., Weiland-Bräuer, N., Rühlemann, M. C., Baines, J. F., Schmitz, R. A., & Reusch, T. B. H. (2020). Differences in the microbiota of native and non-indigenous gelatinous zooplankton organisms in a low saline environment. *The Science of the Total Environment*, 734(139471), 139471. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139471>
- Lewis, G., Bodinger, L. R., & Harte, F. M. (2022). Characterization of ethanol-induced casein micelle dissociation using a continuous protein monitoring unit. *Journal of Dairy Science*, 105(9), 7266–7275. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21522>
- Li, S., Bao, Y., Lv, M., Zhang, L., Liu, L., Liu, Y., & Lu, Q. (2023). Comparative Na⁺ and K⁺ profiling reveals microbial community assembly of alfalfa silage in different saline-alkali soils. *Fermentation*, 9(10), 877. <https://doi.org/10.3390/fermentation9100877>
- Liu, Q., Dong, Z., & Shao, T. (2018). Dynamics of change in fermentation and fatty acid profiles in high moisture alfalfa silage during ensiling at different temperatures. *Ciencia Rural*, 48(3). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170605>
- Mahmoud Hussein Hadwan, Marwah Jaber Hussein, Rawa M Mohammed, Asad M Hadwan, Hawraa Saad Al-Kawaz, Saba S M Al-Obaidy, Zainab Abbas Al Talebi, An improved method for measuring catalase activity in biological samples, *Biology Methods and Protocols*, Volume 9, Issue 1, 2024, bpa015. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpa015>
- Martins, B. T. F., Azevedo, E. C. de, Yamatogi, R. S., Call, D. R., & Nero, L. A. (2021). Persistence of *Yersinia enterocolitica* bio-serotype 4/O:3 in a pork production chain in Minas Gerais, Brazil. *Food Microbiology*, 94(103660), 103660. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103660>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, 38(6), 732–749. <https://doi.org/10.1017/s002217240001158x>
- Nascimento, R. R. do, Edvan, R. L., Nascimento, K. dos S., Barros, L. de S., Bezerra, L. R., Miranda, R. de S., Perazzo, A. F., & Araújo, M. J. de. (2023). Quality of silage with different mixtures of melon biomass with urea as an additive. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 13(2), 293. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020293>
- Navarro-Pérez, M. L., Fernández-Calderón, M. C., & Vadillo-Rodríguez, V. (2022). Decomposition of growth curves into growth rate and acceleration: A novel procedure to monitor bacterial growth and the time-dependent effect of antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3), e0184921. <https://doi.org/10.1128/AEM.01849-21>
- Niyigena, V., Coffey, K. P., Philipp, D., Savin, M. C., Zhao, J., Naumann, H. D., Diaz, J. M., Park, S. P., Rhein, R. L., & Shelby, S. L. (2024). Intake, digestibility, rumen fermentation and nitrogen balance in sheep offered alfalfa silage with different proportions of the tannin-rich legume sericea lespedeza. *Animal Feed Science and Technology*, 308(115863), 115863. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115863>
- 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), 127212. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127212>

- Paray, A. A., Singh, M., & Amin Mir, M. (2023). Gram staining: A brief review. *International Journal of Research and Review*, 10(9), 336–341. <https://doi.org/10.52403/ijrr.20230934>
- Pazos-Rojas, L. A., Cuellar-Sánchez, A., Romero-Cerón, A. L., Rivera-Urbalejo, A., Van Dillewijn, P., Luna-Vital, D. A., Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E., & Bustillos-Cristales, M. D. R. (2023). The viable but non-culturable (VBNC) state, a poorly explored aspect of beneficial bacteria. *Microorganisms*, 12(1), 39. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010039>
- Shah, A. M., Zhang, H., Shahid, M., Ghazal, H., Shah, A. R., Niaz, M., Naz, T., Ghimire, K., Goswami, N., Shi, W., Xia, D., & Zhao, H. (2025). The vital roles of agricultural crop residues and Agro-industrial by-products to support sustainable livestock productivity in subtropical regions. *Animals: An Open Access Journal From MDPI*, 15(8), 1184. <https://doi.org/10.3390/ani15081184>
- Silva, C. de S., Araújo, G. G. L. de, Santos, E. M., Oliveira, J. S. de, Silva, T. G. F. da, Araújo, C. de A., Novaes, J. J. da S., de Macedo, A., de Araújo, J. S., Lima, D. O., Santos, F. N. de S., Campos, F. S., & Gois, G. C. (2025). Fermentative characteristics, nutritional aspects, aerobic stability, and microbial populations of total mixed ration silages based on relocated sorghum silage and cactus pear for sheep diets. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 15(2), 506. <https://doi.org/10.3390/agronomy15020506>
- Socas-Rodríguez, B., Álvarez-Rivera, G., Valdés, A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2021). Food by-products and food wastes: are they safe enough for their valorization? *Trends in Food Science & Technology*, 114, 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.002>
- Sorrentino, L., Fracella, M., Frasca, F., D'Auria, A., Santinelli, L., Maddaloni, L., Bugani, G., Bitossi, C., Gentile, M., Ceccarelli, G., Turriziani, O., Mastroianni, C. M., Antonelli, G., d'Ettore, G., Pierangeli, A., & Scagnolari, C. (2023). Alterations in the expression of IFN lambda, IFN gamma and Toll-like receptors in severe COVID-19 patients. *Microorganisms*, 11(3), 689. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030689>
- Stratton, K. J., Bush, M. J., Chandra, G., Stevenson, C. E. M., Findlay, K. C., & Schlimpert, S. (2022). Genome-Wide Identification of the LexA-Mediated DNA Damage Response in *Streptomyces venezuelae*. *Journal of Bacteriology*, 204(8), e0010822. <https://doi.org/10.1128/jb.00108-22>
- Tatli Seven, P., Seven, I., Iflazoglu Mutlu, S., & Nur Yildirim, E. (2021). Silage additives usage in improving fermentation quality of alfalfa silage: A review. *Animal and Veterinary Sciences*, 9(6), 175. <https://doi.org/10.11648/j.avs.20210906.13>
- Tonelli Nardi, K. (2022). The effects of a nutritional packet (live yeast, vitamins C and B1, and electrolytes) offered during the final phase of feedlot steers on growth performance, nutrient digestion, feeding behavior, and methane emissions (Doctoral dissertation).
- Tuovinen, O. H., Niemelä, S. I., & Rajala-Schultz, P. J. (2025). The role of microbes in ensiling. *Microorganisms*, 13(10), 2237. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13102237>
- Turner, C. E., Bubba, L., & Efstratiou, A. (2019). Pathogenicity factors in group C and G streptococci. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 264–274. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0020-2018>
- Wang, M., Franco, M., Cai, Y., & Yu, Z. (2020). Dynamics of fermentation profile and bacterial community of silage prepared with alfalfa, whole-plant corn and their mixture. *Animal Feed Science and Technology*, 270(114702), 114702. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114702>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

- Warzée, J.-P., Elli, M., Fall, A., Cattivelli, D., & François, J.-Y. (2021). Supranational assessment of the quality of probiotics: Collaborative initiative between independent accredited testing laboratories. *Microorganisms*, 9(7), 1456. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071456>
- Xu, H., Wu, N., Na, N., Sun, L., Zhao, Y., Ding, H., Fang, Y., Wang, T., Xue, Y., & Zhong, J. (2022). Fermentation weight loss, fermentation quality, and bacterial community of ensiling of sweet sorghum with lactic acid bacteria at different silo densities. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1013913. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1013913>
- Yan, H., Gu, S., Li, S., Shen, W., Zhou, X., Yu, H., Ma, K., Zhao, Y., Wang, Y., Zheng, H., Deng, Y., & Lu, G. (2022). Grass-legume mixtures enhance forage production via the bacterial community. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 338(108087), 108087. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108087>
- Zhao, Y., Liu, D., Chen, Y., Lei, Y., Li, M., Wang, J., He, X., Yang, Y., Zhang, X., Liu, S., Zhang, X., Cheng, Q., & Chen, C. (2025). Enhancing alfalfa and sorghum silage quality using agricultural wastes: fermentation dynamics, microbial communities, and functional insights. *BMC Plant Biology*, 25(1), 728. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06722-4>