



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**POBLACIONES DE HONGOS TOXICOGÉNICOS Y FERMENTACIÓN
RUMINAL *in vitro* EN GRANOS DE SORGO ENSILADOS:
Efectos de la variedad del grano, contenido de humedad y tiempo
de almacenamiento**

María del Carmen García y Santos Milburn

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2021



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**POBLACIONES DE HONGOS TOXICOGÉNICOS Y FERMENTACIÓN
RUMINAL *in vitro* EN GRANOS DE SORGO ENSILADOS:
Efectos de la variedad del grano, contenido de humedad y tiempo
de almacenamiento**

María del Carmen García y Santos Milburn

Lina Bettucci

Directora de Tesis

Cecilia Cajarville

Co-directora

2021

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Pablo Zunino, DMTV, M.Sc., Ph.D.

Profesor Titular de Investigación del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IBCE). Universidad de la República, Uruguay.

Adriana Torres, Dr. en Ciencias Biológicas (Ph.D).

Profesor Asociado - Instituto de Investigación en Micología y Micotoxicología, Facultad de Ciencias Exactas Fisicoquímicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Gilberto Vilmar Kozloski, MV, M.Sc., Ph.D.

Professor Associado, Ciências Agrarias, Depto. Zootecnia, sub-área Nutrição e Alimentação animal, Universidade Federal Santa Maria, RS, Brasil.

ACTA DE TESIS DE DOCTORADO

ORIENTACIÓN: Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 17/12/21 – Plataforma Zoom y Presencial

TRIBUNAL: Pablo Zunino, Adriana Torres, Gilberto Kozloski

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
1908863-3	García y Santos Milburn, María del Carmen	MBSS	10

TRIBUNAL

FIRMA

Pablo Zunino



Adriana Torres



Gilberto Kozloski



NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

AGRADECIMIENTOS

A Lina mi tutora, por orientarme, alentarme y acompañarme en los momentos en donde parecía que este estudio no iba a culminar.

A Cecilia, mi cotutora, por sus enseñanzas y apoyo y por abrirme las puertas de su equipo docente y del laboratorio.

A Gonzalo, por su paciencia y apoyo estadístico en los artículos, por las charlas, el tiempo y el espacio compartidos, fueron muchos.

A la gurisada de Tóxico, especialmente Ale y Santi, que estuvieron en todas las etapas y que están esperando ansiosamente la finalización de este proceso, por apoyarme incondicionalmente en las buenas y en las malas. A Laura por la asistencia en los cursos desde su lugar, a Rosma, Rafa, Anita y Ale Mondino, por la colaboración en distintas etapas del estudio, a Leti y Nadia.

A los integrantes del equipo de Nutrición, Alejandro y Analía, por su ayuda en los comienzos de este trabajo y especialmente a Coco, con quien compartí mucho más que un apoyo logístico.

A Martín y Caro, que en distintos momentos y de distintas maneras me auxiliaron en el trabajo de campo y en la revisión de la tesis respectivamente.

A mis tesistas, Ismael Hugo, Deborah Basilio, Juan José Orihuela, Juan Ignacio Dellepiane, Fernando Alegre, Sebastián Olaso, Pierina Besozzi, Ramiro Lago, Marcelo Viera y Gastón Cardozo, por la invaluable ayuda en la realización de este trabajo, sin ellos no hubiera sido posible.

A la Facultad de Veterinaria, esté donde esté, siempre va a ser como mi segunda casa, en especial a toda la gente que día a día hace que uno se sienta como en su propia casa.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica y CONAPROLE por el soporte financiero de este trabajo.

A las Malervas, mujeres guerreras de la familia, por esa paciencia y humor tan particular que nos caracteriza, por tantas vivencias que nos unen.

A mis amigas y mis amigos, por el cariño y aguante a lo largo de tantos años, especialmente a Magda, Ana Inés, Silvia y la Pety.

Finalmente, mi mayor agradecimiento es para mis hijos, Fernando, Mariana y Juan Martín, por ser lo más importante de mi vida y por ser las personas que son.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	2
2.1.	Origen y usos del sorgo	2
2.2.	Producción mundial y local de sorgo	3
2.3.	Características de los granos de sorgo.....	4
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
4.	HIPÓTESIS	12
5.	OBJETIVOS	12
5.1.	Objetivo general	12
5.2.	Objetivos específicos.....	12
6.	ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
6.1.	Estudio experimental de campo	13
6.1.1.	Materiales y métodos	13
6.1.2.	Resultados del estudio experimental de campo.....	17
6.2.	Estudio experimental de laboratorio de hongos y micotoxinas.....	21
6.2.1.	Materiales y métodos	21
6.2.2.	Resultados	25
6.3.	Estudio experimental de laboratorio de fermentación ruminal de gas <i>in vitro</i>	32
6.3.1.	Materiales y métodos	32
6.3.2.	Resultados	33
7.	DISCUSIÓN GENERAL.....	37
8.	CONCLUSIONES GENERALES	43
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
10.	ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Composición química, parámetros de fermentación ruminal <i>in vitro</i> y población fúngica de las muestras de granos de sorgo antes del ensilaje	15
Cuadro 2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la composición química, parámetros de fermentación ruminal <i>in vitro</i> y poblaciones de hongos toxicogénicos de granos de sorgo conteniendo concentraciones altas y bajas de taninos condensados.	20
Cuadro 3. Correlaciones entre composición química, parámetros de fermentación ruminal <i>in vitro</i> y poblaciones fúngicas totales y toxicogénicas	21
Cuadro 4. Análisis estadístico de la frecuencia relativa de <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp. en muestras frescas y almacenadas de granos de sorgo.	28
Cuadro 5. Análisis de la abundancia relativa de <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp. en granos frescos (tiempo 0) y ensilados de dos variedades de sorgo.....	29
Cuadro 6. Análisis estadístico de la abundancia relativa de <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp. en granos frescos (tiempo 0) y ensilados de dos variedades de sorgo.....	30
Cuadro 7. Análisis estadístico de las interacciones entre contenido de humedad y tiempo de almacenamiento sobre las abundancias relativas de <i>Penicillium</i> spp. y <i>Aspergillus</i> spp. de dos variedades de granos de sorgo.....	31
Cuadro 8. Efectos de las variedades, de los contenidos de humedad (bajo, medio y alto) y de los diferentes tiempos de almacenamiento (30, 90 y 180 días) sobre los parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> de granos de sorgos ensilados	34
Figura 1. Recolección de granos de sorgo frescos previo al ensilaje (tiempo 0) en cada uno de los 5 establecimientos y procedimiento realizado en los silos experimentales, tratamientos de humedades (bajo, medio y alto) y tiempo de almacenamiento (30, 90 y 180 días).	23
Figura 2. Distribución de especies abundantes y raras de <i>Aspergillus</i> en muestras frescas y almacenadas de granos de sorgo	26

Figura 3. Distribución de especies abundantes y raras de *Fusarium* en muestras frescas y almacenadas de granos de sorgo27

Figura 4. Efecto de los contenidos de humedad (CH: bajo, medio y alto) y tiempo de almacenamiento (30, 90 y 180 días) sobre la producción de gas (a). (Letras distintas indican diferencia significativa dentro del mismo rango de humedad).35

Figura 5. Efecto del contenido de humedad (bajo, medio y alto) y el tiempo de almacenamiento (30, 90 y 180 días) sobre la tasa fraccional de producción de gas (kd). Letras distintas indican diferencia significativa dentro del mismo rango de humedad.....35

Figura 6. Efecto del contenido de humedad (bajo, medio y alto) sobre la tasa fraccional de producción de gas (kd) de granos de sorgo de variedades con concentraciones altas (AT) o bajas (BT) de taninos. Letras distintas indican diferencia significativa dentro de la variedad.....36

Figura 7. Efecto del contenido de humedad (bajo, medio y alto) sobre el tiempo de latencia (L) de granos de sorgo de variedades con concentraciones altas (AT) o bajas (BT) en taninos. Letras distintas indican diferencia significativa dentro de la misma variedad.....36

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis de doctorado fue evaluar el efecto de la variedad, el contenido de humedad y el tiempo de almacenamiento sobre las poblaciones fúngicas toxicogénicas y los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* en granos de sorgo ensilados húmedos. Se realizaron tres estudios experimentales, el primero en condiciones de campo en donde se obtuvieron muestras de cuatro establecimientos lecheros comerciales al momento de la cosecha de granos de sorgo de variedades altas y bajas en concentraciones de taninos, almacenados húmedos en silo-bolsas. Los granos de estos silos fueron evaluados al inicio (tiempo 0) y a los 30, 90 y 180 días de almacenamiento. En estas muestras se analizaron la composición química, los parámetros de fermentación *in vitro* y las poblaciones fúngicas totales y las toxicogénicas. Los resultados de este estudio sugieren que 180 días de almacenamiento fue beneficioso al reducir la concentración de taninos condensados, aumentando la velocidad de fermentación de los granos y minimizando la contaminación fúngica, tanto en las variedades altas como bajas en taninos. Ya a los 90 días se vieron las condiciones óptimas para minimizar la contaminación con hongos toxicogénicos. Los otros dos estudios, fueron realizados en condiciones de laboratorio, a partir de las muestras de granos de sorgo colectados al momento de la cosecha de los establecimientos del primer estudio más un quinto establecimiento. Estas muestras fueron almacenadas en silos experimentales, recibieron tres tratamientos de humedad diferentes y fueron evaluadas a los 30, 90 y 180 días de almacenamiento. En el segundo estudio se analizaron hongos toxicogénicos y micotoxinas y en el tercero la fermentación ruminal *in vitro*. Los resultados del segundo estudio evidenciaron una baja contaminación por hongos toxicogénicos y micotoxinas. En tanto que la colonización de *Penicillium* spp. se vio favorecida en los granos almacenados en relación con los granos frescos antes del ensilaje. Las poblaciones de *Fusarium* spp. disminuyeron después de los 30 días de almacenamiento lo mismo que las de *Aspergillus* spp. en granos con alto contenido de taninos. En el tercer estudio, los granos de sorgo de variedad baja en taninos produjeron un mayor volumen de gas. Los granos de sorgo de variedad alta en taninos fermentaron mejor con un contenido de humedad medio, en cambio, los granos bajos en taninos fermentaron mejor con un contenido de humedad alto. Tanto los granos de sorgo altos como los bajos en taninos mostraron una mejor fermentación ruminal con un mayor tiempo de almacenamiento. Los resultados de estos estudios sugieren que granos de sorgo de variedades altas o bajas en taninos, ensilados con un contenido de humedad entre 26 y 32% y almacenados por un tiempo mínimo de 90 días, óptimo 180 días, serían las condiciones ideales que favorecen la fermentabilidad de los granos y minimizan la contaminación fúngica y de micotoxinas. Es importante realizar un monitoreo periódico del ensilaje de sorgo en diferentes momentos de acuerdo con la evolución de la población de hongos y la producción de micotoxinas.

SUMMARY

The objective of this doctoral thesis was to evaluate the effect of variety, moisture content and storage time on toxicogenic fungal populations and *in vitro* ruminal fermentation parameters in sorghum grains with high moisture content. Three experimental studies were performed, the first under field conditions where samples sorghum grains of varieties high and low in tannin concentrations, were obtained from four commercial dairy farms at the moment of harvesting for high-moisture grain silage, grains were harvested at approximately 30% moisture content. The grains of these silos were evaluated at the freshly harvest grains (time 0) and at the 30, 90 and 180 days of storage. In these samples, the chemical composition, the *in vitro* ruminal fermentation parameters, and the total fungal and toxicogenic populations were analyzed. The results of this study suggest that 180 days of storage was beneficial by reducing the concentration of condensed tannins, increasing the fermentation rate of the grains and minimizing fungal contamination, both in high and low tannin varieties. Optimal conditions were seen after 90 days to minimize contamination with toxic fungi. The other two studies were performed under laboratory conditions, from the samples of sorghum grains collected at the time of harvest from the farms of the first study plus a fifth establishment. These samples were stored in experimental silos, received three different moisture content treatments, and were evaluated after 30, 90 and 180 days of storage. Toxicogenic fungi and mycotoxins were analyzed in the second study, and *in vitro* fermentability in the third. The results of the second study showed low contamination by toxicogenic fungi and mycotoxins. While the colonization of *Penicillium* spp. it was favored in stored grains relative to fresh grains before silage. The populations of *Fusarium* spp. they decreased after 30 days of storage, the same as those of *Aspergillus* spp. in grains with high tannin content. In the third study, the low-tannin variety sorghum grains produced a higher volume of gas. Sorghum grains of the high-tannin variety fermented better with a medium moisture content, whereas the low tannin grains fermented better with a high moisture content. Both high and low tannin sorghum grains showed better fermentability with longer storage time. The results of these studies suggest that sorghum grains of varieties high or low in tannins, ensiled with a moisture content between 26 and 32% and stored for a minimum time of 90 days, optimal 180 days, would be the ideal conditions that favor the fermentability of the grains and minimize fungal and mycotoxin contamination. It is important to periodically monitor sorghum silage at different times according to the evolution of the fungal population and mycotoxin production.

1. INTRODUCCIÓN

El sorgo es el quinto cultivo cerealero de mayor importancia económica en el mundo, con una producción media, en las últimas dos décadas, de 60,2 millones de toneladas, pasando a ser uno de los granos de cereales más utilizados en alimentación animal (De Bernardi, 2019). Es así como la casi totalidad del sorgo comercializado en mercados internacionales se destina a la alimentación del ganado. En este sentido, el 95% del grano de sorgo producido en Uruguay se consume a nivel interno, evidenciando la relevancia del cultivo en los sistemas pecuarios del país (Methol, 2013). Por otra parte, constituye un recurso importante para la alimentación humana aportando energía, proteínas, vitaminas y minerales fundamentalmente en poblaciones que viven en condiciones de pobreza en regiones semiáridas o áridas (Visarada & Aruna, 2019). Además de su importancia como alimento, proporciona materia prima para la producción de almidón, fibra, jarabe de dextrosa, biocombustibles y alcohol entre otros productos (Machio, 2016).

La producción de biomasa proveniente del sorgo, debido a su tolerancia a factores de estrés, su eficiente uso del agua y adaptabilidad, lo hacen un cultivo ideal en el escenario de cambio climático (Degener, 2015). Sumado a estas características, el incremento del cultivo estaría propiciado por su precio favorable en relación con otros cereales como el maíz (Curbelo, 2010). Sin embargo, los granos de sorgo tienen la desventaja de presentar menor digestibilidad que otros cereales. Esto se debe a la proporción de endospermo periférico y córneo que lo hace resistente a la degradación y a la asociación de la matriz proteica con los gránulos de almidón (Hibberd *et al.*, 1982; Waniska, 2000; Offner *et al.*, 2003).

El valor nutritivo del sorgo depende del genotipo y del tipo de procesamiento recibido, sea quebrado, molido, ensilado, entre otros (Streeter *et al.*, 1990; Owens & Zinn, 2005). El quebrado y el molido, aumentan el área de contacto y vuelven más frágil la estructura del grano, favoreciendo su digestión (Owens *et al.*, 1997). Mientras que, la reconstitución de granos secos con agregado de agua (Balogun *et al.*, 2005) y el ensilaje con humedad mayor a 25%, mejoran la digestibilidad y el valor nutritivo (Mitaru *et al.*, 1984; Aguerre *et al.*, 2015). Estudios del proceso de ensilaje de los granos húmedos sobre la composición química, fermentación ruminal *in vitro* y sitio de digestión, mostraron, tanto una disminución en la concentración de taninos condensados y de proteína como una mayor fermentación *in vitro* y cambios en el sitio de digestión (Curbelo, 2010; Torterolo *et al.*, 2012).

En sistemas de almacenamiento, como los ensilajes, es fundamental mantener la calidad y el valor nutricional de los granos, siendo el deterioro por hongos y la contaminación por micotoxinas uno de los mayores riesgos que presentan (Richard *et al.*, 2009; González Pereira *et al.*, 2011; Alonso *et al.*, 2013). Entre los géneros fúngicos toxicogénicos encontrados en ensilajes, los más importantes son *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Sweeney & Dobson, 1998; D'Mello *et al.*, 1999; Cheli *et al.*, 2013). Sumado al deterioro producido por estos hongos, está el riesgo de contaminación por las micotoxinas que producen algunas de sus especies (Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

Esta tesis presenta estudios experimentales realizados en condiciones de campo y de laboratorio, que tuvieron como objetivo evaluar el efecto de la variedad, contenido de humedad y tiempo de almacenamiento sobre las poblaciones fúngicas toxicogénicas y los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* en granos de sorgo ensilados húmedos.

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Origen y usos del sorgo

El sorgo es originario de África (Kimber, 2000), el registro más antiguo tendría más de 5000 años de antigüedad y provendría de una excavación arqueológica cerca de la frontera entre Egipto y Sudán. Posteriormente se extendió por todo el continente africano, India, China, Australia y el resto del mundo. No se tienen registros de cuando llegó al continente americano, pero se supone que, las primeras semillas probablemente llegaron en barcos de esclavos procedentes de África. Tanto el sorgo dulce como el sorgo de grano se cultivaron en el siglo XIX y los sorgos híbridos se desarrollaron por primera vez en la década de 1950 en los Estados Unidos. En América del Sur, el cultivo de sorgo tuvo una gran expansión a partir de mediados del siglo XX (Taylor, 2018).

Las plantas de sorgo son una fuente energética, proteica, de vitaminas y de minerales para millones de personas que viven en regiones semiáridas de África y Asia, en donde además de cultivarse para consumo propio se utiliza como alimento del ganado. En estas poblaciones se consume entero o transformado en harina con la que se preparan productos horneados, extruidos y otros productos, sustituyendo total o parcialmente otros cereales. Además, se utiliza para hacer almidón, azúcar, jarabes, alcohol, cerveza y productos de malta (Visarada & Aruna, 2019). Se han desarrollado variedades de sorgo de calidad alimentaria para el procesamiento de estos nuevos productos alimenticios (Tuinstra, 2008). A su vez, el sorgo dulce, es un recurso energético renovable y alternativo de biocombustible. Es así como, los productos derivados del bioetanol del sorgo dulce podrían sustituir en parte a los combustibles fósiles (Ahmad Dar *et al.*, 2018).

El sorgo también es utilizado a nivel mundial en la alimentación animal de rumiantes, cerdos y aves de corral. Como el precio por tonelada es inferior al del grano de maíz, es una muy buena alternativa para la suplementación de bovinos y ovinos en pastoreo (Aguerre *et al.*, 2015) y como insumo energético en las dietas para cerdos y aves (Brambillasca *et al.*, 2019). Es con esta finalidad que es especialmente difundido en Australia y América, así como en Tailandia, Japón y Europa. En ganadería, las opciones del uso del sorgo son variadas, ya que se puede utilizar como verdeo de verano, pastoreo diferido, reservas en forma de silo de grano húmedo y de planta entera o como concentrado. Además, aporta elevadas cantidades de rastrojo lo que contribuye a mejorar la cobertura de los suelos (Carrasco *et al.*, 2011). Particularmente, en Uruguay, el 95% del grano de sorgo producido se consume a nivel interno en los sistemas productivos pecuarios del país (Methol, 2013).

2.2. Producción mundial y local de sorgo

La producción de sorgo alcanzó niveles históricos en el mundo al colocarse entre los cinco cereales más importantes, siendo antecedido por maíz, trigo, arroz y cebada. El sorgo es una gramínea tropical, adaptada genéticamente a diversos ambientes, con un sistema radicular profundo y bien desarrollado (De Bernardi, 2019). Por ser un cultivo con bajos requerimientos hídricos y tolerancia a sequías, se posiciona como alimento preponderante en la alimentación humana y animal. Es por estas características que se considera dentro de los cereales más importantes, fundamentalmente en las regiones afectadas por el cambio climático (Hadebe *et al.*, 2017).

En las últimas dos décadas la producción mundial promedio de sorgo ha alcanzado 60,2 millones de toneladas (De Bernardi, 2019). Estados Unidos es el mayor productor, con más del 16% de la producción mundial, en tanto que la producción de Centroamérica y el Caribe está dominada por México; en América del Sur se concentra en Argentina y zonas áridas de Brasil. La producción en Europa se limita a pequeñas áreas en Francia, Italia y Ucrania. Australia es el único productor importante de Oceanía, mientras que China e India son los principales países productores en Asia, con más del 85% del total de la región (Visarada & Aruna, 2019). De acuerdo con la distribución de la producción por continentes, el 42.9% corresponden al continente americano, el 38.1% al africano, 18% al asiático, 3% al de Oceanía y solo el 1,3% corresponde a Europa (De Bernardi, 2019).

En Uruguay, igual que en el resto del mundo, la producción de sorgo ha venido incrementándose en las últimas décadas, pasando de una producción de 84.700 toneladas en la zafra 2004/2005 a 212.000 toneladas en la zafra 2017/2018 (DIEA, 2019). El rendimiento promedio a nivel nacional en ese mismo período de tiempo ha sido 3,68 toneladas por hectárea y no solo ha aumentado, sino que ha superado ampliamente el rendimiento medio mundial de 1,40 toneladas por hectárea (FAOSTAT, 2020).

2.3. Características de los granos de sorgo

El sorgo es un cultivo de origen tropical, perenne en condiciones ideales, pero adaptado mediante procedimientos de mejoramiento genético a diferentes ambientes. Es una graminéa de metabolismo fotosintético C4, con numerosas especies que representan una amplia diversidad dentro del género (Taylor, 2018). La fotosíntesis C4 surgió durante el Oligoceno, hace 25-32 millones de años aparentemente propiciada por la disminución en la concentración atmosférica de CO₂ a menos de 500 ppm. Luego durante el Mioceno, hace 6-7 millones de años, las plantas C4 se convirtieron en un grupo ecológico importante (Cerling *et al.*, 1997). En estas plantas se reduce al mínimo la fotorrespiración, ya que la fijación inicial de CO₂ y el ciclo de Calvin se realizan en tipos de células diferentes. Estas ventajas bioquímicas se reflejan en una mejor utilización de agua, CO₂ y nutrientes, así como en una conservación más efectiva de la humedad del suelo y de tolerancia a la sequía. La tolerancia del sorgo a la sequía también se debe a la presencia de un sistema radicular muy desarrollado y profundo, la transpiración mínima, el enrollamiento de sus hojas y el mayor número de estomas. A su vez, poseen la capacidad de enlentecer los procesos metabólicos o "latencia" y suspender el crecimiento hasta que se den las condiciones favorables para continuar su desarrollo (Carrasco *et al.*, 2011).

El grano de sorgo, como otros cereales, está constituido por tres componentes anatómicos característicos, el pericarpio, que es la parte más externa, el germen o embrión con tejido de reserva y el endospermo que almacena el almidón. El pericarpio está constituido a su vez por el epicarpio, el mesocarpio y el endocarpio. Presenta, además, la testa, constituida por una capa de células fuertemente coloreadas ubicada debajo del endocarpio y que se encuentra en algunos genotipos de sorgo, característica mediada por un par de genes. Es en esta capa donde se encuentran los taninos condensados (TC) que aparecen con la maduración del grano y se observan como una capa continua de color marrón rojizo. A su vez, el pericarpio puede presentar diferentes coloraciones, blanca, amarilla o rojas, característica también controlada genéticamente. No obstante, si los pericarpios son muy gruesos pueden enmascarar el color de la testa y del endospermo (Serna-Saldivar & Espinosa-Ramírez, 2019).

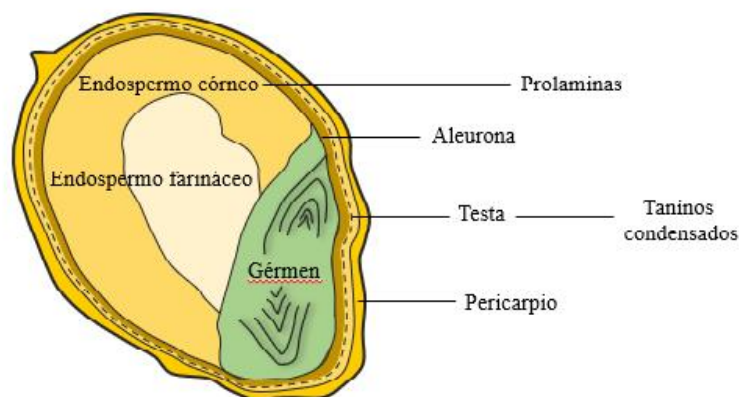


Figura 1. Estructura del grano de sorgo. Adaptada de Earp & Rooney, 1982.

El endospermo es el componente más importante del grano y se diferencia en el endospermo periférico, ubicado debajo de la aleurona, el córneo y el farináceo (Rooney & Pflugfelder, 1986). En los endospermos córneo y farináceo el almidón se dispone en forma de gránulos, presentando diferencias en la estructura y disposición según el tipo de endospermo (Huntington, 1997). Los gránulos de almidón en el endospermo córneo son comprimidos y están rodeados por una matriz proteica continua. Mientras que, en el farináceo, hay una mayor concentración de gránulos más grandes que se encuentran rodeados por una matriz proteica discontinua (Bean *et al.*, 2019). A su vez, la matriz del endospermo córneo está formada por proteínas de difícil digestión, prolaminas (kafirinas) y gluteinas, en cambio la del farináceo está formada por albuminas y globulinas de fácil digestión (Rooney & Pflugfelder, 1986; Huntington, 1997).

Los granos de sorgo tienen una mayor proporción de endospermo periférico y córneo, siendo este último el que le da mayor resistencia a la penetración y ataque enzimático, haciendo que el almidón sea de menor digestibilidad en comparación con otros cereales (Rooney & Pflugfelder, 1986). Esa gran proporción de endospermo córneo, sumado a que su matriz proteica está asociada con los gránulos de almidón y a que algunos genotipos presentan TC, hacen que los granos de sorgo sean considerados de menor valor nutritivo que otros granos (Huntington, 1997, Offner *et al.*, 2003).

2.3. Taninos condensados, variedades de sorgo y producción de gas *in vitro*

Los taninos son compuestos no nitrogenados, polifenólicos de alto peso molecular, 500 a 3000 Dalton, que poseen una complejidad variable (Makkar, 2003). Se clasifican en dos grupos, los hidrolizables y los condensados, ambos tipos son muy reactivos debido a la gran cantidad de hidroxilos fenólicos que poseen (Reed, 1995). Los hidrolizables poseen un carbohidrato central con ligadura de ácidos fenólicos carboxílicos, mientras que los TC son una mezcla de polímeros flavonoides (Van Soest, 1994). Estos flavonoides son la estructura básica de los TC y sus precursores son el acetato y la fenilalanina, originados a partir del metabolismo de carbohidratos y de proteínas respectivamente (Ribeiro-Pereira *et al.*, 2007).

Solo las variedades de sorgos con testa pigmentada poseen TC, sustancias que pueden afectar el valor nutricional y la aceptabilidad del grano. No obstante, son los TC los que le confieren al cultivo una mayor resistencia al ataque de pájaros y hongos. Es así como estas variedades de sorgos son muy difundidas en ciertas regiones donde ocurren ataques de pájaros que pueden llegar a afectar toda una plantación (Blakely *et al.*, 1979). La resistencia otorgada por los TC se debería a la astringencia que ocurre cuando estos compuestos se unen y precipitan a la glicoproteína salivar, ocasionando así un aumento en la salivación y una menor aceptabilidad (Reed, 1995).

El color del grano de sorgo se asocia con el contenido de TC, pero no siempre es indicador del su contenido en los diferentes genotipos de sorgo (Boren & Waniska, 1992). Es así como el contenido de TC depende de la presencia o no de testa en los granos de sorgo. Los granos de sorgo que poseen un pericarpio delgado, TC, endospermo córneo y glumas grandes y compactas son considerados más resistentes a condiciones ambientales adversas (Serna-Saldivar & Espinosa-Ramírez, 2019).

Altas concentraciones de TC disminuyen el consumo voluntario y la digestibilidad del forraje, lo que limita el uso del sorgo como base en la dieta de los animales, principalmente en los monogástricos (Magalhaes *et al.*, 1997). Esa merma en el consumo se debe a tres factores, el poder astringente, la menor degradabilidad de la MS en el rumen y el incremento de ciertas hormonas peptídicas (Kumar & Vaithiyanathan, 1990).

Según Kumar & Singh (1984), los alimentos ricos en TC deben ser ofrecidos con ciertas restricciones, ya que pueden provocar disminución en la producción de leche, en la digestibilidad del azufre y provocar alteraciones a nivel de intestino, hígado, bazo y riñón. Sin embargo, los rumiantes adaptados a dietas ricas en estos compuestos poseen microorganismos capaces de alterar o destruir integralmente estas sustancias, disminuyendo su toxicidad (Hibberd *et al.*, 1985).

Para minimizar las consecuencias negativas de los TC sobre el valor nutritivo, los granos de sorgo pueden someterse a diferentes métodos de procesamiento, mejorando así su digestibilidad (Mitzner *et al.*, 1994). El rolado y el molido del grano, reduciendo el tamaño de partícula, logran aumentar el área de contacto y vuelven la estructura más frágil y accesible para la digestión (Owens *et al.*, 1997). Por otro lado, la aplicación de vapor y de presión, procesamientos poco comunes en nuestro país, aumentarían en mayor medida la digestibilidad del grano, afectando positivamente la performance animal (Owens & Zinn, 2005). Otros tratamientos como la germinación y reconstitución de granos secos con agua (Balogun *et al.*, 2005) y la fermentación anaeróbica con un contenido de humedad mayor al 25% (Lopes *et al.*, 2017), también pueden mejorar el valor nutritivo del sorgo. De hecho, un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo (Aguerre *et al.*, 2015) mostró que una combinación de germinación y ensilado de granos de sorgo reducía el contenido de taninos, aumentando la degradabilidad ruminal y su digestibilidad.

Existen técnicas como las de producción de gas *in vitro* que permiten determinar la magnitud y la cinética de fermentación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou *et al.*, 1994). Estas técnicas estiman los valores de digestibilidad *in vivo*, ya que los datos obtenidos *in vitro* son validados mediante experimentos (Mauricio *et al.*, 2003). El análisis de los datos obtenidos *in vitro* se basa en modelos matemáticos de estimación del índice y grado de digestión acumulativa de los alimentos a partir de la producción de perfiles de gas (López *et al.*, 2007). Además, estas técnicas son económicas, tienen alta repetibilidad y permiten evaluar gran cantidad de sustratos. Son utilizadas en estudios de diferentes alimentos, debido a que posibilitan información simultánea sobre la cinética de fermentación ruminal.

En este sentido una de estas técnicas de producción de gas *in vitro* semi-automática ha permitido evaluar diferentes ensilajes de híbridos de sorgo (Mauricio *et al.*, 2003). En estudios de nuestro grupo de trabajo utilizando esta técnica para evaluar el efecto del ensilaje de granos de sorgo, mostraron que variedades bajas en taninos presentaron mayor fermentación ruminal *in vitro* que las altas en taninos (Curbelo, 2010).

2.4. Ensilaje

El ensilaje es un proceso de conservación de alimentos utilizado desde hace miles de años por los egipcios. Sin embargo, su utilización se incrementó a partir de la década de 1960, pasando a ser uno de los principales métodos de conservación de forrajes en sistemas de producción ganadera de zonas templadas del mundo (Cheli *et al.*, 2013). En el ocurre una conservación química en condiciones de anaerobiosis por acción de microorganismos y se producen ácidos que inhiben la descomposición del forraje. Este proceso conlleva varias etapas que, dependiendo del material ensilado, concluyen en 30 a 40 días (Chiossone *et al.*, 2011).

El material para ensilar puede ser tanto planta entera, como grano húmedo o seco. El ensilaje del grano cosechado con una humedad comprendida entre 25 y 35% es uno de los tratamientos más comúnmente usados, ya que la digestibilidad de los granos así tratados podría ser similar a la que se obtiene por aplicación de vapor y presión (Owens & Zinn, 2005). En Uruguay, particularmente, el ensilaje de grano húmedo ha tenido un rol preponderante en los sistemas productivos lecheros y ganaderos del país. Este proceso refiere a la conservación en condiciones de anaerobiosis del grano cosechado con una humedad comprendida entre el 23 y el 40 % (siendo el óptimo 28 %) sin previo secado (Chalkling & Brasesco, 1997).

La cosecha temprana y el ensilaje como grano húmedo son una alternativa económica que ha demostrado ser efectiva en cuanto al incremento del valor nutritivo del sorgo (Huntington, 1997; Curbelo, 2010). Son los niveles de carbohidratos solubles, el contenido de materia seca superior al 20% y la estructura física que favorece la compactación durante el llenado de la bolsa del silo, factores que hacen del sorgo un cultivo ideal para ensilar. El uso del ensilaje de grano húmedo de sorgo como suplemento para los animales es una alternativa de intensificación en los sistemas ganaderos. El contenido de humedad y el procesamiento del grano mejoran la digestión de los granos por parte de los rumiantes (Rovira & Velazco, 2012).

Una vez que el material fresco ha sido picado, almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, comienzan las cuatro fases del proceso del ensilaje. La primera *fase aeróbica* que va desde la cosecha al ensilaje dura unas pocas horas y dependerá de la cantidad de oxígeno disponible. En esta etapa, el oxígeno atmosférico disminuye rápidamente debido a la respiración de los granos y a los microorganismos aerobios y aerobios facultativos como levaduras y enterobacterias (OudeElferink *et al.*, 2001).

La primera fase es muy importante ya que en ella se suprime la actividad de bacterias aerobias que son indeseables en el proceso de fermentación (Knický, 2005). Por lo tanto, cuanto menos tiempo dure, más rápido sea el llenado del silo, mejor se realice la compactación del material y el sellado de la estructura, menores serán las pérdidas de nutrientes por respiración. A su vez, las bacterias lácticas tendrán más sustrato para actuar, posibilitando así una mejor conservación (Barnes *et al.*, 2003). En caso de que la exposición al aire se prolongue en esta etapa, se corre el riesgo de que se produzca una excesiva respiración aumentando la temperatura del grano lo que puede llevar a la desnaturalización de la proteína. En esta fase el nivel de pH es de 6,5 a 6,0 (Chalkling, 2016).

La segunda fase, *de fermentación*, comienza cuando ha desaparecido el aire del silo (OudeElferink *et al.*, 2001). A medida que el oxígeno va disminuyendo, se inicia la fermentación y predominan las bacterias aerobias facultativas. Estas convierten azúcares en una variedad de ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico y algunas veces ácido butírico), dióxido de carbono e hidrógeno. Estos ácidos son responsables de la disminución temprana del pH del silo, lo que lleva a un cambio en la población bacteriana, con el desarrollo de bacterias ácido lácticas (BAL), responsables de la producción de ácido láctico fundamental para obtener una adecuada conservación. El pH llega a descender a 4 - 4,5 (Gomes de Araújo, 2008).

Dependiendo del material ensilado y de las condiciones en el momento del ensilaje esta segunda fase puede durar desde una semana hasta más días, siendo la fase más larga (Chalkling, 2016). Posteriormente cuando el pH llegó al mínimo en la fase anterior y la mayoría de los microorganismos disminuyen su presencia, ocurre la *fase de estabilización*, aquí el material ensilado se conserva sin perder más calidad (OudeElferink *et al.*, 2001). El nivel de pH del silo será un buen indicador de la calidad y del tipo de fermentación ocurrida. El pH final dependerá en gran medida del material ensilado, siendo entre 4 y 4,5 el pH óptimo en los silos de grano húmedo de sorgo (Chalkling, 2016).

La última fase del proceso, *de deterioro aeróbico*, comienza con la apertura del silo y exposición al aire. A su vez esta fase puede dividirse en dos etapas. La primera, donde la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras y ocasionalmente bacterias, producen ácido acético. Esto aumenta el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa, en donde aumenta la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje. Además, aparecen microorganismos aeróbicos facultativos, como mohos y enterobacterias. Esta fase ocurre en casi todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire. Sin embargo, el deterioro dependerá de la concentración y de la actividad de los microorganismos presentes en esa etapa (Honig & Woolford, 1980). La pérdida del valor nutritivo de los granos y la contaminación fúngica toxicogénica al momento de la apertura, serían las principales desventajas de este tipo de ensilajes (Chalkling & Bradesco, 1997).

2.5. Contaminación con hongos toxicogénicos durante el ensilaje

Los hongos toxicogénicos presentan la capacidad de producir micotoxinas, metabolitos secundarios de bajo peso molecular y alta toxicidad que se producen en la fase de crecimiento exponencial o durante la fase estacionaria (Zain, 2011). La colonización por estos hongos en alimentos de origen vegetal puede ocurrir durante la cosecha, el transporte o el almacenamiento (Ogunade *et al.*, 2018). La presencia de hongos toxicogénicos en granos almacenados disminuye notoriamente su valor nutricional. Además, las micotoxinas producidas representan un riesgo para la salud animal y humana. Por lo tanto, los granos deben almacenarse de manera segura después de la cosecha en épocas específicas del año para garantizar el suministro durante el resto del año (Mannaa & Kim, 2017).

Los principales géneros toxicogénicos contaminantes de alimentos son *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Moss, 1996). Los hongos del género *Fusarium* debido a su capacidad de colonización y dispersión son generalmente contaminantes de cultivos, desarrollándose previo al almacenamiento. Esto provoca pérdidas en el rendimiento de los cultivos y el riesgo de contaminación con micotoxinas (Whitlow & Hagler, 2005). Además, muchas de las especies de este género, son fitopatógenas, causando lesiones en tallos y raíces e infecciones en las espigas, lo que aumenta las pérdidas económicas en la producción agrícola. En cambio, los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se desarrollan mayormente en almacenamiento (Scudamore & Livesey, 1998; Zinedine *et al.*, 2007).

En materiales ensilados, la presencia de hongos y micotoxinas ha sido bien documentada desde Woolford (1975) hasta la fecha. En este sentido, países como Alemania (Auerbach, 1998), Estados Unidos (Mansfield *et al.*, 2008), Francia (Richard *et al.*, 2009), Dinamarca (Storm *et al.*, 2014), Brasil (Keller *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2015), Italia (Gallo *et al.*, 2016) entre otros, han reportado diferentes niveles de contaminación por micotoxinas. El desarrollo de hongos toxicogénicos y la aparición de micotoxinas depende de factores intrínsecos y extrínsecos al propio sustrato, siendo los últimos los más relevantes. Es así como las condiciones de la cosecha o del almacenamiento, la disponibilidad de agua y la temperatura, entre otros, son fundamentales. A su vez, la humedad del sustrato y la del ambiente, son los factores más determinantes que favorecerán o impedirán el desarrollo fúngico (Scussel, 1998). Humedades superiores al 12% y niveles de oxígeno por encima del 0.5% permiten el crecimiento de mohos en los alimentos. Estas condiciones ocurren en los ensilajes cuando se presentan “bolsas” de oxígeno. Sin embargo, el pH bajo de estos alimentos suele prevenir el desarrollo de mohos, pero a su vez estimular el crecimiento de levaduras, lo que elevará el pH, favoreciendo finalmente el crecimiento de los mohos (Chalkling & Bradesco, 1997). Es por este motivo como durante el proceso de ensilaje, los granos pueden contaminarse con mohos y micotoxinas, fenómeno que también estará condicionado por el nivel de humedad y la temperatura de los silos (Alonso *et al.*, 2013; Cheli *et al.*, 2013).

Tanto las levaduras como los mohos pueden crecer en un ambiente ácido (pH inferior a 7), siendo el rango de pH para el crecimiento de levaduras de 3,5 a 4,5 y para los mohos de 3,5 a 8,0. La actividad ácida y la actividad hídrica (*aw*) controlan e inhiben el crecimiento bacteriano, pero los hongos pueden crecer en una gama más amplia de condiciones fisicoquímicas que la mayoría de las bacterias. Los hongos crecen en productos alimenticios a partir de pH < 2 en ácidos orgánicos y > 9 en aguas minerales, con *aw* de 0,61 a 0,99 (Snyder *et al.*, 2019). Si bien estos hongos pueden desarrollarse en los alimentos sin producir micotoxinas, frente a determinados factores estresantes pueden comenzar a sintetizarlas. En general, las condiciones climáticas extremas, el mal manejo en la cosecha o problemas en el almacenamiento, son los principales factores que pueden desencadenar estrés y por ende contribuir a la producción de micotoxinas (Whitlow & Hagler, 2005).

Se conocen más de 300 micotoxinas (FAO, 2004), de estas algunas son relevantes a nivel mundial ya que al ser consumidas pueden afectar la salud del hombre y los animales, ocasionando enfermedades que se conocen como micotoxicosis (Sweeney & Dobson, 1998).

La producción de las toxinas de *Fusarium* puede ocurrir antes o después de la cosecha si no es tratada y secada adecuadamente. Entre las principales micotoxinas producidas por este género, y dependiendo de factores ambientales se encuentran los tricotecenos, que incluyen el deoxynivalenol (DON), nivalenol, toxina T-2 y diacetoxyscirpenol (DAS); zearalenona y fumonisinas (Yiannikouris & Jouany, 2002). Dentro de los tricotecenos, el deoxinivalenol que produce rechazo al alimento en los suinos, sería el de mayor interés productivo (Mok *et al.*, 2013) así como la zearalenona con acción estrogénica que actúa como disruptor endócrino (Zinedine *et al.*, 2007). A su vez, las fumonisinas en equinos producen un cuadro de leucoencefalomalacia (Marasas *et al.*, 1988), mientras que en suinos, edema pulmonar (Harrison *et al.*, 1990).

El género *Aspergillus* produce aflatoxinas que son de gran relevancia en salud pública, ya que la aflatoxina B₁ y su metabolito M₁ eliminado por leche y huevo, son micotoxinas carcinogénicas. La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), clasifica a la AFB₁ en el grupo 1A, por ser hepatotóxica y carcinogénica para el hombre y a la AFM₁ en el grupo 1B como potencial carcinogénico (IARC, 1993; IARC, 2002). Además de ser sustancias hepatotóxicas y carcinogénicas, las aflatoxinas son teratogénicas y mutagénicas (Zain, 2011). Químicamente son difurano-cumarinas, termorresistentes, manteniéndose estables durante los procesos térmicos a los que se someten los alimentos (Urrego & Diaz, 2006). En este género, se consideran actualmente siete subgéneros con dos o tres secciones cada uno y más de 200 especies (Klich, 2002; Pitt & Hocking, 2009). Entre las numerosas secciones, se encuentra la sección Flavi, compuesta por 33 especies, dentro de las cuales se encuentra *A. flavus*. Esta especie es conocida por la producción de aflatoxinas del tipo B, sin embargo, recientemente fueron encontradas cepas que pueden producir aflatoxinas también del tipo G (Frisvad *et al.*, 2019). Por otra parte, no todas las cepas de *A. flavus* son toxicogénicas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción mundial de sorgo alcanzó un nivel histórico en las últimas décadas, fenómeno que se ha visto reflejado también a nivel nacional, tanto por las ventajas agronómicas como por la gran difusión de la práctica del ensilaje de grano húmedo en nuestro país. Entre las ventajas, el sorgo tiene menor costo operativo en relación con otros cereales y es considerado una fuente energética importante para la alimentación animal, principalmente en sistemas de producción bovina. A su vez, es resistente a sequías, inundaciones y altas temperaturas, condiciones todas que lo posicionan como un alimento preponderante en la alimentación humana y animal. Sin embargo, el grano de sorgo desde su formación y a lo largo de su cadena productiva, está expuesto a la colonización de gran variedad de hongos, lo que puede traer aparejado pérdidas en el valor nutritivo y/o contaminación con micotoxinas. La presencia de micotoxinas en los ensilados puede producir una disminución en la producción de leche o carne, afectar la calidad de la leche y en casos graves producir enfermedad, problemas de fertilidad e incluso la muerte de animales. Todo esto se traduce en importantes pérdidas económicas para los sectores lechero y ganadero del país.

Con el propósito de buscar estrategias que permitan controlar y prevenir el problema de la contaminación con hongos y micotoxinas que conlleva un riesgo para la salud pública y una pérdida de la calidad nutricional en los ensilajes húmedos destinados a la alimentación de bovinos, esta tesis pretende evaluar el efecto de la variedad de grano, niveles de humedad y tiempo de almacenamiento en silos de grano húmedo de sorgo sobre las poblaciones de hongos toxicogénicos y los parámetros de fermentación *in vitro*. Se espera que el presente estudio proporcione recomendaciones prácticas sobre las condiciones de ensilaje que permitan reducir las poblaciones fúngicas toxicogénicas y las micotoxinas, mejorando la calidad nutricional y sanitaria del alimento conservado como silo húmedo.

4. HIPÓTESIS

1. Las altas concentraciones de taninos condensados en algunas variedades de sorgo tienen un efecto protector sobre la contaminación por hongos toxicogénicos y micotoxinas y afectan favorablemente la fermentación ruminal *in vitro* cuando los granos son ensilados húmedos.
2. Humedades superiores a 32% o inferiores a 25% en los granos de sorgo ensilados favorecen el crecimiento de poblaciones fúngicas toxicogénicas y afectan negativamente la producción de gas *in vitro*.
3. El mayor tiempo de almacenamiento durante el ensilaje húmedo de granos de sorgo disminuye el riesgo de contaminación de hongos y micotoxinas, pero afecta negativamente la producción de gas *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar en condiciones de campo y de laboratorio el efecto de los taninos condensados, del contenido de humedad y del tiempo de almacenamiento de los granos de sorgo ensilados sobre las poblaciones de hongos toxicogénicos y micotoxinas y la producción de gas *in vitro*.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de las concentraciones de taninos condensados y del tiempo de almacenamiento sobre la composición química, los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y las poblaciones de hongos toxicogénicos en granos de sorgo ensilados húmedos en condiciones de campo.
2. Estudiar la influencia de las variedades de sorgo, contenido de humedad y del tiempo de almacenamiento sobre las poblaciones de hongos toxicogénicos en granos de sorgo ensilados húmedos en condiciones experimentales de laboratorio.
3. Estudiar la influencia de las variedades de sorgo, contenido de humedad y del tiempo de almacenamiento sobre la producción de gas *in vitro* en granos de sorgo ensilados húmedos en condiciones experimentales de laboratorio.

6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Para comprobar las hipótesis y objetivos planteados la presente Tesis de Doctorado se desarrolló en base a tres estudios experimentales simultáneos. En el primer estudio experimental, que corresponde con el objetivo específico 1, se realizó un muestreo en condiciones de campo en cuatro chacras de establecimientos lecheros comerciales donde se cosecharon granos de diferentes variedades de sorgo almacenados húmedos en silo-bolsas. El segundo y tercer estudio experimental, fueron realizados en condiciones de laboratorio, a partir de las muestras de granos de sorgo colectados al momento de la cosecha de los establecimientos del primer estudio más un quinto establecimiento. Estas muestras fueron almacenadas en silos experimentales con tres tratamientos de humedad y tres tiempos de almacenamiento diferentes. El estudio experimental 2 fue realizado para analizar los hongos toxicogénicos y micotoxinas (objetivo específico 2). En este estudio se realizaron 45 silos experimentales. En el estudio experimental 3, se evaluó la fermentación ruminal *in vitro* (objetivo específico 3), aquí se agregaron tres réplicas, por lo que se completaron 135 silos experimentales.

Los resultados del primer estudio experimental fueron publicados en un artículo en la revista *Animal Nutrition* (Anexos). Los resultados del segundo estudio experimental correspondientes con el objetivo 2 han sido aceptados para su publicación en la revista *Journal of Food Protection* (Anexos). Los resultados correspondientes con el objetivo específico 3 se presentan como manuscrito y prontamente serán enviados a revisión (Anexos).

6.1. Efecto de la variedad de grano y el tiempo de almacenamiento en silo-bolsas

En Uruguay, como en otros países, se ha incrementado el uso de ensilaje de grano húmedo de sorgo para la alimentación del ganado. Concomitantemente es escasa la información relacionada con las características químicas, cinéticas de fermentación y las poblaciones de hongos toxicogénicos en este tipo de alimentos. Por este motivo el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la variedad de grano y el tiempo de almacenamiento sobre la composición química, los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y las poblaciones de hongos totales y de géneros toxicogénicos en ensilajes de grano de sorgo.

6.1.1. Materiales y métodos

El procedimiento con animales de este estudio fue aprobado por la Comisión de Experimentación y Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (FVET) de la UdelaR, Uruguay (CEUAFVET-PI 472/17). El trabajo se realizó en cuatro establecimientos comerciales particulares de productores lecheros ubicados en los departamentos de San José y Flores (33°33'28.3" S 56°52'37.7" W y 34°31'07.5" S 56°32'21.1" W).

Para la selección de los establecimientos se consideró la variedad de grano de sorgo utilizada para preparar los ensilajes húmedos. De esta forma, se obtuvieron dos muestras de ensilaje elaboradas con variedades de sorgo alto en taninos (AT, genotipos Morgan 108 y ACA 558) y dos elaboradas con variedades con bajo contenido en taninos (BT, genotipos Flash 10 y ACA 546). La muestra de cada genotipo se consideró replica para la variedad (AT o BT). Los granos se cosecharon con aproximadamente un 30% de contenido de humedad, se quebraron mecánicamente y se almacenaron en bolsas de poliestireno de 250 μm de espesor. Las bolsas de silo tenían un largo de 60 m, 1,7 m de altura y 2,5 m de diámetro, y cada una contenía aproximadamente 180 toneladas de grano. Se recolectaron muestras (n=16) de grano durante el proceso de ensilaje (día 0) y posteriormente de las bolsas de silo a los 30, 90 y 180 días. Las submuestras de granos de sorgo se obtuvieron manualmente con un calador perforando en seis puntos equidistantes a lo largo del silo a 50 cm de profundidad horizontal en transectos en tres niveles (superior, medio e inferior). Las submuestras de granos se mezclaron y homogeneizaron para obtener 1 kg de muestra de todos los puntos y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Análisis químicos

El contenido de materia seca (MS), cenizas y proteína cruda (PC) de las muestras de sorgo se determinó de acuerdo con los métodos oficiales de la AOAC descritos en los procedimientos 934.01, 923.93 y 984.13 respectivamente (AOAC, 1997). El contenido de materia orgánica (MO) se calculó como la diferencia entre MS y cenizas. El análisis de fibra neutro detergente (FNDA) se basó en los procedimientos descritos por Mertens (2002), usando α -amilasa termoestable y expresada incluyendo cenizas residuales. Los niveles de fibra de detergente ácido (FAD) se determinaron de acuerdo con Van Soest et al. (1991) en un analizador de fibra ANKOM 220 (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, EE. UU.). El contenido total de almidón se determinó usando un kit de ensayo de almidón total (K-TSTA 06/17, Megazyme Int., Wicklow, Irlanda). Los taninos condensados se analizaron con el método butanol-HCl descrito por Makkar (2000). El pH se midió en el lugar inmediatamente después de obtener las muestras utilizando un medidor de pH digital (EW-05991-36, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, EE. UU.) y mezclando 10 g de grano con 100 mL de agua destilada.

La composición química, los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y la población fúngica total y toxicogénica de los granos de sorgo antes del proceso de ensilaje se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química, parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y población fúngica de las muestras de granos de sorgo antes del ensilaje.

	Establecimientos			
	1	2	3	4
MS (g/kg)	651.5	637.9	613.0	795.9
Composición química				
(g/kgMS)				
MO	975.2	978.9	980.7	981.6
FNDa	278.6	201.6	151.5	172.9
FAD	86.0	112.1	37.8	71.9
Almidón	587.2	695.2	701.6	684.5
PC	83.5	73.3	76.0	99.8
TC	12.3	7.8	0.9	0.7
pH	4.89	5.95	4.53	6.53
Parámetros fermentación				
a (mL de gas/g MO incubado)	314.1	352.1	314.7	305.6
kd (h ⁻¹)	0.059	0.07	0.053	0.054
L (h)	2.87	2.53	2.96	3.02
Poblaciones fúngicas (ufc)				
Hongos totales	22	90	10	171
<i>Fusarium</i>	0	6	0	25
<i>Aspergillus</i>	15	56	1	1
<i>Penicillium</i>	2	23	3	4

MS, materia seca; MO, materia orgánica; FNDa, fibra detergente neutra ensayada con amilasa termoestable y expresada incluyendo cenizas residuales; FAD, fibra de detergente ácido expresada incluyendo cenizas residuales; PC, proteína cruda; TC, taninos condensados; a, producción potencial de gas (mL de gas / g MO incubado); kd, tasa fraccional de producción de gas (h⁻¹); L, tiempo de retraso de la producción de gas (h); los ensilajes 1, 2, 3 y 4 son muestras de los genotipos Morgan 108, ACA 558, Flash 10 y ACA 546, respectivamente.

Producción de gas in vitro

Para evaluar la fermentación ruminal de los granos de sorgo antes y después del proceso de ensilado, se evaluó la cinética de fermentación de los granos utilizando la técnica de producción de gas *in vitro* acumulativa, según Mauricio *et al.* (1999). Las muestras se pesaron (0,5 g de MS) y se colocaron en frascos de 100 mL. Luego, se agregaron a cada botella de fermentación 18 mL de una solución buffer que contenía $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 18 mL de una solución buffer compuesta de NaHCO_3 y NH_4HCO_3 y 4 mL de una solución reductora que contenía NaOH y Cisteína HCl y se eliminó el aire del interior de los frascos mediante una corriente de CO_2 , como describen Mould *et al.* (2005). Posteriormente, las botellas se sellaron con tapones de caucho butílico y se almacenaron a 4 ° C durante 12 h para hidratar los sustratos. Antes de la inoculación, las botellas se precalentaron en un baño de agua a 39 ° C durante 2 h. Luego, cada botella fue inoculada con 10 mL de una mezcla de fluidos simples de 2 vacas Holstein canuladas en rumen, alimentadas con una dieta compuesta por heno de avena *ad libitum*, 3,3 kg de grano de sorgo, 1,7 kg de harina de soja, 50 g de urea y 30 g de premezcla mineral. Inmediatamente después de la inoculación, los matraces se volvieron a gasear con una corriente de CO_2 ; los tapones de butilo se sujetaron con precintos rizados de aluminio y permanecieron en el baño de agua durante todo el período de medición. Se incubaron tres frascos por genotipo y tiempo de almacenamiento (48 frascos que contenían sustrato, más tres sin sustrato incluidos como blancos de inóculo; en total: 51 frascos), y todo el procedimiento se realizó en dos corridas. Todas las botellas incubadas por genotipo y tiempo de almacenamiento se consideraron repeticiones analíticas. La producción de gas se midió en los frascos a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h después de la inoculación utilizando un transductor fijado a un medidor de presión (840065, Sper Scientific, Scottsdale, AZ, EE. UU.) y registrado en unidades psi. El volumen de gas en mL se predijo a partir de los valores de psi utilizando una ecuación obtenida en un ensayo anterior realizado en las mismas condiciones experimentales. Los datos de producción acumulada de gas se ajustaron al modelo:

$V = a \times (1 - e^{-kd \times (t-L)})$, donde " V " es la producción acumulada de gas en el tiempo t (mL / g de DM incubada), "a" es la producción potencial de gas (mL / g DM incubado), "kd" es la tasa fraccional de producción de gas (h⁻¹) y "L" es el tiempo de latencia de la producción de gas (h).

Análisis micológico

Para el aislamiento de hongos se seleccionaron aleatoriamente 100 granos de sorgo y se desinfectaron superficialmente con NaOCl al 0,4% durante un minuto, posteriormente se hicieron tres lavados con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo de papa dextrosa agar (PDA: Agar 20 g; Dextrosa 20 g; Papas blancas 250 g; 1000 mL agua destilada). Se incubaron a 25 ° C de temperatura, alternando ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra durante 7 a 10 días.

Las colonias desarrolladas fueron contadas y transferidas a medios específicos y se identificaron bajo microscopio óptico (40x) por sus características micro y macromorfológicas de acuerdo con las claves de identificación convencionales correspondientes (Ellis, 1976; Nelson *et al.*, 1983; Klich & Pitt, 1988; Klich, 2002; Burgess *et al.*, 1994; Samson *et al.*, 1995; Leslie & Summerell, 2006). Se utilizó luz negra para inducir la esporulación de algunos cultivos. Los hongos que no pudieron esporular después de un mes se consideraron micelios estériles. La abundancia relativa de géneros se calculó de acuerdo con McMullen & Stack (2017), para cada contenido de taninos y tiempo de almacenamiento como el número de aislamientos de un taxón de hongos / número total de aislamientos.

Análisis estadístico

La homogeneidad de la varianza de los datos se evaluó mediante PROC UNIVARIATE de SAS (versión 9.0). Los datos de composición química de los ensilajes, la cinética de fermentación ruminal *in vitro* y las poblaciones de hongos totales y toxicogénicos se analizaron mediante el procedimiento MIXED de SAS (versión 9.0) mediante el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + (G \times T)_{ij} + \epsilon_{ijk},$$

donde Y_{ijk} es la variable en estudio, μ es la media, G_i el efecto fijo de la variedad de grano ($i = AT$ o BT , cada una con dos réplicas de genotipo), T_j es el efecto fijo del tiempo de almacenamiento ($j = 0, 30, 90$ y 180 días), $(G \times T)_{ij}$ la interacción entre el genotipo y el tiempo de almacenamiento, y ϵ_{ijk} es el error residual. El efecto del silo se incluyó como aleatorio. Se testearon los efectos lineal y cuadrático del efecto fijo del tiempo de ensilaje sobre los genotipos altos y bajos. Se utilizó el procedimiento PROC GLM de SAS (versión 9.0) para comparar la composición química, la fermentación *in vitro* y las poblaciones de hongos toxicogénicos entre materiales fermentados y no fermentados independientemente del tiempo de almacenamiento. Además, se utilizó la correlación de Pearson y el análisis PROC CORR de SAS (versión 9.0) para determinar las relaciones significativas entre la composición química y los parámetros de fermentación *in vitro* con las poblaciones de hongos totales y toxicogénicos. La significancia se declaró en $P < 0,05$ y las tendencias en $P < 0,10$.

6.1.2. Resultados

La composición química de los granos de sorgo se vio afectada de manera diferente por el tiempo de almacenamiento dependiendo de si los granos eran AT o BT (variedad de grano \times interacción tiempo; $P < 0,01$; Cuadro 2). Para la variedad AT, el contenido de MS y MO aumentó hasta los 90 días del ensilaje y disminuyó hacia los 180 días ($P < 0,01$), mientras que para la variedad BT, MS y MO disminuyeron linealmente ($P < 0,01$) a un ritmo creciente hacia los 180 días del ensilaje.

El contenido de almidón aumentó lineal y cuadráticamente en los granos AT ($P < 0,05$). El contenido de proteína cruda aumentó linealmente en ambas variedades de sorgo ($P < 0,01$), mientras que el contenido de TC decreció linealmente, lo que representó una disminución del 70% en los granos AT y del 50% en los granos BT.

En general, los granos fermentados tuvieron concentraciones de TC más bajas que los no fermentados (5,42 vs 3,00 g / kg, SEM = 0,527, $P = 0,05$). Se observó una respuesta lineal y cuadrática del pH durante el tiempo de almacenamiento tanto en los sorgos AT como en los BT, revelando una reducción del pH a una tasa decreciente a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$).

En cuanto a los parámetros de fermentación ruminal *in vitro*, la producción potencial de gas se vio afectada por la variedad de sorgo ($P = 0,03$), y los sorgos AT produjeron más gas que los sorgos BT (Cuadro 2). Tanto las variedades como el tiempo de almacenamiento alteraron la tasa fraccional de producción de gas (kd) ($P < 0,01$), y este parámetro aumentó linealmente con el tiempo de almacenamiento para ambas variedades ($P < 0,05$). No hubo diferencias entre los granos fermentados y no fermentados (0 d vs. 30, 90 y 180 d, no mostrados en el cuadro 2) en el volumen de gas producido, pero los fermentados produjeron gas más rápidamente (kd 0,06 vs 0,07 por h, SEM = 0,002, $P = 0,04$) y con un tiempo de retraso más corto (2,85 frente a 2,62 h, SEM = 0,044, $P = 0,02$).

Los granos fermentados mostraron un menor número de colonias de hongos totales (73,3 vs 44,9, SEM = 5,849, $P = 0,03$), *Aspergillus* (18,2 vs 6,6, SEM = 2,189, $P = 0,02$) y *Fusarium* (7,7 vs 1,7, SEM = 0,927, $P < 0,01$) para granos fermentados y no fermentados, respectivamente. Las poblaciones totales de hongos y particularmente de los tres géneros toxicogénicos evaluados se vieron afectadas por el tiempo de almacenamiento ($P < 0,01$), y hubo una interacción variedad \times tiempo para el número de colonias de *Aspergillus* y *Penicillium* ($P < 0,01$).

Se observó una reducción lineal en el número de colonias de *Aspergillus* en la variedad AT ($P < 0,01$) a una tasa decreciente ($P < 0,01$), mientras que se detectó un aumento lineal en el aislamiento de *Penicillium* en los sorgos BT ($P < 0,01$). También se observaron efectos cuadráticos para todas las poblaciones de hongos en la variedad AT ($P < 0,05$) y en los aislamientos totales y de *Fusarium* en la variedad BT ($P < 0,05$; Cuadro 2).

Las poblaciones totales de hongos y *Fusarium* se correlacionaron positivamente con el contenido de MS ($P < 0,01$) y PC de los ensilajes ($P < 0,01$), mientras que se encontró una correlación negativa entre el número de *Aspergillus* y el contenido de PC ($P < 0,05$; Cuadro 3). El contenido de FAD se correlacionó positivamente con el número de colonias de *Aspergillus* ($P < 0,05$), pero esta correlación fue negativa para el número de colonias de *Penicillium* ($P < 0,05$). El contenido de almidón se correlacionó positivamente con el total de hongos ($P < 0,05$) y el número de colonias de *Penicillium* ($P < 0,01$).

El contenido de TC se correlacionó negativamente con el número de colonias de *Fusarium* y *Penicillium* ($P < 0,05$) y mostró una tendencia a estar correlacionado negativamente con el número total de colonias de hongos ($P = 0,08$), pero esta correlación fue positiva para el número de colonias de *Aspergillus* ($P < 0,01$). También se encontraron correlaciones positivas entre el pH del ensilaje y el número de colonias del total de hongos, *Fusarium* y *Aspergillus* ($P < 0,01$). En cuanto a los parámetros de fermentación, se observó una correlación negativa entre la tasa de producción de gas y el número de colonias de *Fusarium* ($P < 0,05$).

Cuadro 2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la composición química, parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y poblaciones de hongos toxicogénicos de granos de sorgo conteniendo concentraciones altas y bajas de taninos condensados.

Nivel de taninos	AT				BT				SEM ^a	P ^b			AT P ^c		BT P ^d	
	0	30	90	180	0	30	90	180		G	T	G*T	L	Q	L	Q
Tiempo de almacenamiento	0	30	90	180	0	30	90	180	SEM ^a	G	T	G*T	L	Q	L	Q
MS, g/kg	730	773	808	757	786	772	785	736	47,2	0,97	<,01	<,01	0,28	<,01	<,01	0,06
Composición química, g/kg MS																
MO	977	983	983	982	981	981	981	975	1,9	0,50	<,01	<,01	0,08	<0,01	<0,01	0,05
FNDa	215	215	205	194	187	168	224	198	2,0	0,37	0,69	0,37	0,50	0,97	0,23	0,21
FAD	99,0	64,1	109,4	83,4	54,8	71,3	75,1	63,8	7,01	<,01	<,01	<,01	0,94	0,34	0,70	0,13
Almidón	641	629	628	697	693	671	740	698	13,1	<,01	<,01	<,01	<,01	0,02	0,32	0,07
PC	78,6	79,0	82,5	84,2	87,7	90,6	91,9	99,9	7,26	0,27	<,01	<,01	<,01	0,38	<,01	0,36
TC	10,05	7,35	5,75	3,00	0,80	0,80	0,70	0,40	0,54	<,01	<,01	<,01	<,01	0,23	<,01	0,26
pH	5,42	4,43	4,50	4,54	5,53	4,44	4,04	4,48	0,38	0,85	<,01	0,22	0,02	<,01	0,03	<,01
<i>Parámetros in vitro</i>																
a, mL/g DM	333	325	334	329	310	313	319	294	13,6	0,03	0,70	0,84	0,92	0,88	0,42	0,39
kd, h ⁻¹	0,065	0,079	0,073	0,082	0,054	0,047	0,067	0,071	<,001	<,01	<0,01	0,07	0,01	0,71	0,01	0,74
L, h	2,63	2,40	2,46	2,51	2,43	2,71	2,59	2,49	0,37	0,70	0,10	0,66	0,61	0,15	0,93	0,61
<i>Poblaciones fúngicas (% contaminación)</i>																
Hongos totales	56,0	25,5	34,5	64,0	90,5	38,0	40,0	67,0	28,02	0,71	<,01	0,42	0,15	<,01	0,68	0,01
<i>Fusarium</i>	3,0	0,0	0,0	1,5	12,5	3,0	0,5	5,0	3,82	0,41	<,01	0,06	0,58	0,01	0,16	<,01
<i>Aspergillus</i>	35,5	14,0	3,0	4,5	1,0	17,0	1,0	0,0	6,43	0,24	<,01	<,01	<,01	<,01	0,14	0,44
<i>Penicillium</i>	12,5	4,0	6,0	14,5	3,5	14,0	15,0	28,5	4,39	0,22	<,01	<,01	0,17	<,01	<,01	0,94

AT, altos taninos; BT, bajos taninos; a SEM, error estándar de la media (n = 16); b Nivel de significancia de los genotipos, el tiempo de ensilaje y la interacción tiempo ensilaje y genotipo; c Nivel de significancia de los efectos lineal y cuadrático de los genotipos AT; d Nivel de significancia de los efectos lineal y cuadrático de los genotipos BT; MS, materia seca; MO, materia orgánica; FNDa, fibra neutro detergente con α -amilasa termoestable y expresada incluyendo cenizas residuales; FAD, fibra ácido detergente expresada incluyendo cenizas residuales; PC, proteína cruda; TC, taninos condensados; a, producción potencial de gas (mL de gas/g MS incubado); kd, tasa fraccional de producción de gas (h⁻¹); L, tiempo de latencia de la producción de gas (h).

Cuadro 3. Correlaciones entre composición química, parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y poblaciones fúngicas totales y toxicogénicas.

	PS	Hongos totales	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
MS	R	0,375**	0,429**	-0,151	-0,031
FAD	R	-0,026	-0,116	0,348*	-0,309*
Almidón	R	0,286*	0,200	-0,218	0,682***
PC	R	0,432**	0,469***	-0,336*	0,209
TC	R	-0,259	-0,287*	0,390**	-0,347*
pH	R	0,775***	0,792***	0,489***	-0,119
a	R	-0,163	-0,096	0,268	-0,119
kd	R	-0,182	-0,400*	-0,213	0,037
L	R	0,080	0,245	-0,081	-0,250

PS, parámetros estadísticos; MS, materia seca; FAD, fibra ácido detergente; PC, proteína cruda; TC, taninos condensados; a, producción potencial de gas (mL de gas/g MS incubado); kd, tasa fraccional de producción de gas (h⁻¹); L, tiempo de latencia de producción de gas (h); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

6.2. Análisis de hongos toxicogénicos y micotoxinas en silos experimentales

Los granos de cereales suelen ser ensilados para mejorar su valor nutricional, siendo una de las principales fuentes de alimentación del ganado lechero. Sin embargo, durante el almacenamiento, los granos pueden contaminarse con hongos toxicogénicos. Es así como el sorgo, uno de los cereales de mayor importancia económica del mundo, es ensilado para ser utilizado como alimento en los sistemas ganaderos de nuestro país. Es con el propósito de estudiar la influencia de las variedades de sorgo, contenido de humedad y del tiempo de almacenamiento sobre las poblaciones de hongos toxicogénicos en granos de sorgo ensilados húmedos en condiciones experimentales de laboratorio que se presenta este trabajo.

6.2.1. Materiales y métodos

Procedimiento de muestreo y tratamientos de granos en los silos

Antes del inicio del proceso de ensilaje se recolectaron muestras de granos de sorgo de variedades AT y BT que contenían humedad entre 26-32% de cinco establecimientos comerciales ubicados en los departamentos de San José, Flores y Canelones (33 ° 33 '28 ,3 '' S 56 ° 52'37,7 '' W y 34 ° 31'07,5 '' S 56 ° 32'21,1 '' W), en la zona centro-sur de Uruguay. La precipitación durante el período de crecimiento del sorgo (abril-junio) fue de 300 mm, similar a la precipitación promedio correspondiente a estos meses.

Los establecimientos comerciales fueron seleccionados en un estudio previo de acuerdo con las variedades de granos de sorgo utilizados para preparar ensilajes (García y Santos *et al.*, 2020). Tres de los establecimientos produjeron variedades consideradas altas en taninos (AT > 5 g/kg MS de concentración de taninos condensados). El establecimiento 1 produjo genotipo Morgan 108 (12,3 g/kg MS de taninos) y los establecimientos 2 y 3 genotipo ACA 558 (7,8 y 5,6 g/kg MS de taninos, respectivamente). Los otros dos establecimientos produjeron variedades consideradas bajas en concentración de taninos (BT <1 g/kg MS de concentración de taninos condensados). El establecimiento 4 produjo genotipo Flash 10 (0,9 g/kg MS de taninos) y el establecimiento 5 produjo ACA 546 (0,7 g/kg MS de taninos).

Se recolectaron de los 5 establecimientos aproximadamente 30 kg de granos de sorgo, en total 150 kg; de estos 30 kg, 3 kg (en total 15 kg) de granos frescos quebrados, con humedad entre 26-32% fueron mezclados, homogeneizados y evaluados al tiempo 0. El remanente de 135 kg de granos fue manualmente compactado bajo condiciones de laboratorio. En condiciones de campo, los granos de sorgo húmedo de Uruguay son almacenados en bolsas de silo con un amplio rango de contenido de humedad (CH) de 16 al 40% (Chalkling & Brasesco, 1997). Dado que se han detectado problemas de fermentación tanto en niveles de humedad altos como en bajos, en este estudio se utilizaron tres rangos de humedad. Los mismos fueron: bajo (15-25%, granos secados a temperatura ambiente), medio (26-32%, con el mismo CH que traían los granos al momento de la cosecha) y alto (33-42%, granos humedecidos artificialmente con agua destilada) para evaluar cuál era el mejor para almacenar los granos de sorgo. Así se prepararon 45 silos, 15 silos con cada tratamiento de humedad para ser abiertos en 3 momentos diferentes del tiempo de almacenamiento: 30, 90 y 180 días.

Se analizaron un total de 50 muestras, 5 muestras de granos recién cosechados (3 de AT y 2 de BT) en el momento 0 (una muestra de cada establecimiento) y las 45 muestras restantes de silos experimentales (27 de 3 AT + 18 de 2 BT) con los 3 niveles de humedad. De los 45 silos, 15 se abrieron a los 30 días, otros 15 a los 90 días y los 15 restantes a los 180 días de almacenamiento. Los silos experimentales (Ojeda *et al.*, 1990), consistieron en envases plásticos (Copolímero aleatorio de polipropileno, ATMA®, Uruguay) fueron de 3 kg de capacidad, blancos, redondos, de 12 cm de alto y 20 cm de diámetro, según la metodología propuesta por Aguerre *et al.* (2015) y Brambillasca *et al.* (2019). Los silos se cerraron y sellaron herméticamente. En cada tiempo de almacenamiento (30, 90 y 180 días), se pesaron para evaluar si se había producido una variación del contenido de humedad. Si la variación oscilaba entre 0-1%, se consideró que las modificaciones en el contenido de humedad eran innecesarias. Para el análisis micológico se abrieron los silos, se recolectaron granos al azar y posteriormente se descartaron.

En la figura 2 se presenta el esquema que explica la preparación de los silos experimentales a partir de los granos de sorgo obtenidos en el momento previo al ensilaje de campo, los tratamientos de humedad y los distintos momentos de apertura de los silos (tiempo de almacenamiento). El esquema se repitió con las muestras provenientes de cada uno de los 5 establecimientos comerciales.

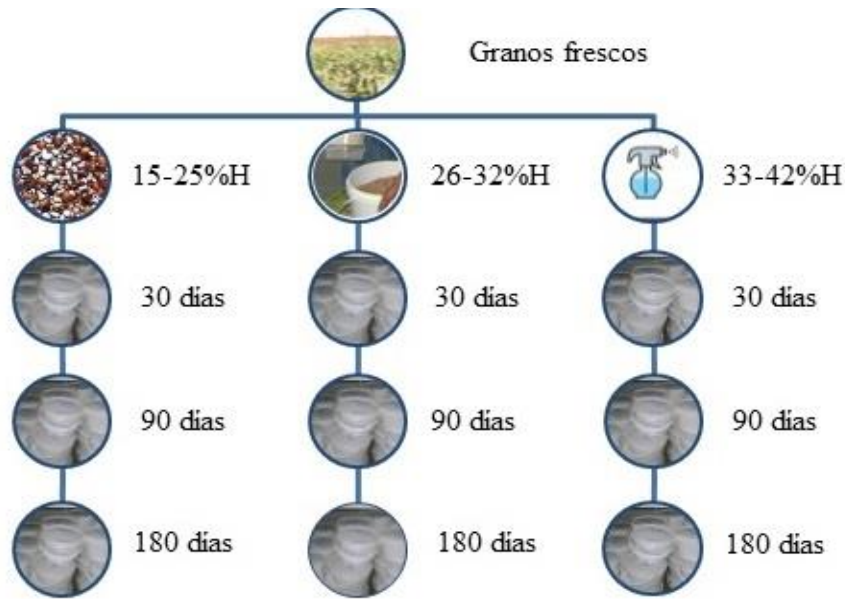


Figura 2. Recolección de granos de sorgo frescos previo al ensilaje (tiempo 0) en cada uno de los 5 establecimientos y procedimiento realizado en los silos experimentales, tratamientos de humedades (bajo, medio y alto) y tiempo de almacenamiento (30, 90 y 180 días).

Análisis químico

El contenido de humedad de los granos al momento de almacenarlos en los silos experimentales de laboratorio se determinó mediante el método oficial 925.10 (AOAC, 2000). Se secó un crisol en un horno a 105 ° C durante 1 hora y se colocó en desecadores para que se enfriara. Los taninos condensados se analizaron con el método butanol-HCl descrito por Makkar (2000).

Análisis micológico

Para el aislamiento de hongos, se seleccionaron al azar 100 granos de sorgo de cada muestra, se desinfectaron en la superficie con una solución al 0,4% de NaOCl durante 1 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Posteriormente, las semillas se colocaron en placas de Petri que contenían agar dextrosa de patata (Sigma-Aldrich, 70139), las placas se incubaron a 25 ° C durante 7 a 10 días. Al final de este período, las colonias resultantes se transfirieron a medios de cultivo selectivos para su aislamiento: Extracto de levadura Czapek Agar suplementado con los antibióticos BC-RB para *Aspergillus* spp. (Cotty, 1994); AFPA para el grupo *Aspergillus flavus* (Pitt *et al.*, 1983) y CZID para *Fusarium* spp. (Abildgreen *et al.*, 1987; Thrane, 1996; Leslie & Summerell, 2006).

La identificación se realizó según las guías disponibles para *Aspergillus* spp. (Klich, 2002); para el grupo *Aspergillus flavus* (Pitt *et al.*, 1983); para *Penicillium* spp. (Pitt, 1979; Pitt *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2008; Visagie *et al.*, 2014) y para *Fusarium* spp. (Nelson *et al.*, 1983; Burgess *et al.*, 1994; Klassen & Nelson, 1998; Leslie & Sumner, 2006; Hawksworth, 2012; Aoki *et al.*, 2014; Leslie, 2014).

La frecuencia de aislamiento y la abundancia relativa de géneros o especies se calcularon de acuerdo con McMullen & Stack (2017) para cada contenido de taninos, contenido de humedad y tiempo de almacenamiento: la frecuencia relativa se calculó como el número de muestras de ocurrencia / número total de muestras y la abundancia como el número de aislamientos de un taxón de hongos / número total de aislamientos.

Análisis de micotoxinas

La detección rápida de aflatoxinas totales (AF), por triplicado de cada muestra, se realizó mediante ELISA utilizando el kit comercial Ridascreen® Fast Aflatoxin SC (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania), según el método AOAC (2002). Aproximadamente 2 g de cada muestra se pulverizaron, pesaron y extrajeron con 10 mL de una mezcla de metanol-agua (7 + 3) para separar las aflatoxinas. Se añadió extracto de muestra (100 µl) y conjugado de enzima HRP (100 µL, diluido en BSA al 1% en PBS) a los pocillos recubiertos con anticuerpo y la solución mezclada se incubó durante 60 min. Después de lavar con PBS / T, se añadió solución de sustrato / cromógeno (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina / peróxido de hidrógeno en tampón acetato, pH 5,5, 100 µL) a todos los pocillos de prueba y la placa se incubó durante 30 min. La placa se leyó en un modo de longitud de onda dual (450/650 nm) después de detener el desarrollo del color con ácido sulfúrico 1,25 M (50 µL). Para los pocillos de control y blanco, se utilizó metanol al 16% y extracto de muestra diluido para sus respectivas curvas estándar. La absorbancia final se calculó restando la absorbancia de los correspondientes pocillos en blanco (color de fondo). El límite de detección de AF (ELISA) fue de 2 µg/kg y el rango de detección de 2-100 µg/kg.

El estándar de aflatoxina B₁ (AFB₁) o el extracto de muestra sin diluir (50 µL) y el conjugado de enzima HRP (100 µL, diluido en BSA al 1% en PBS) (en un ensayo directo) o un antígeno de recubrimiento (en un ensayo indirecto) se prepararon a partir de un hapteno que es estructuralmente similar pero no idéntico al utilizado para la producción de anticuerpos. La detección y cuantificación de AFB₁ de cada muestra se hizo por triplicado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo con la metodología propuesta por Trucksess *et al.* (1994). Se colocó 25 g de muestra y 100 mL de acetonitrilo: agua (84:16 v / v) en un mezclador de alta velocidad durante 3 min. La mezcla se filtró a través de papel de filtro Whatman® n° 4 y se pasó una alícuota de 5 mL de este filtrado a través de una columna de limpieza MycoSep® 224 (Romer Labs® Inc., Union, MO, EE. UU.), Se llevaron a sequedad dos mL de este extracto y luego se resuspendieron en 400 µL de agua: metanol: acetonitrilo a (4: 1: 1 v / v). Se derivatizó una alícuota (200 µL) con 700 µL de ácido trifluoroacético-ácido acético-agua (20: 10:70, v / v).

Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna de fase inversa (sílica gel, 150 x 4,6 mm de diámetro interno, tamaño de partícula de 5 μm , VARIAN, Inc, Palo Alto, EE. UU.). Se utilizó metanol-agua (60:40 v / v) como fase móvil a un caudal de 1 mL min⁻¹. La fluorescencia de los derivados de AF se registró a ~ 360 nm y ~ 460 nm. Se construyeron curvas estándar con diferentes niveles de AFB₁. Esta toxina se cuantificó correlacionando las alturas de los picos de los extractos de muestra con las de las curvas estándar. El rango de recuperación de AFB₁ fue 73-98%, el rango de detección 0,02-2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el rango de cuantificación 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ – 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y el límite de cuantificación de AFB₁ 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (European Commission, 2002/32/EC, 2002). El límite de detección del método analítico fue de 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Pereyra *et al.*, 2010).

El análisis de fumonisinas se realizó por triplicado mediante ELISA utilizando el kit comercial Ridascreen® Fast Fumonins (R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania). Se pesaron aproximadamente 5 g de muestra molida y se extrajo con 25 mL de mezcla de metanol-agua (7 + 3) para separar las fumonisinas. El extracto de la muestra se agitó vigorosamente durante tres minutos con un agitador, se filtró a través de papel de filtro Whatman ® n° 1 y se diluyó 1:14 (1 + 13) con agua destilada. Luego, se agregaron 50 μL a cada pocillo de microvaloración con volúmenes iguales de conjugado de enzima y solución de anticuerpo anti-fumonisina y la mezcla se incubó durante 10 min. Después del lavado, se añadió al pocillo 100 μL de solución de sustrato / cromógeno, se mezclaron y se incubaron durante 5 min en la oscuridad. La reacción se detuvo con 100 μL de ácido sulfúrico 1 N. El límite de detección de fumonisinas fue de 0,222 mg/kg y el rango de detección: 0,222-6 mg/kg, según las especificaciones del fabricante.

Análisis estadísticos

La frecuencia relativa de los aislamientos de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* se evaluó mediante las pruebas de chi-cuadrado y test de Fisher. La abundancia relativa de los hongos toxicogénicos y micotoxinas se determinó mediante el modelo de regresión logística para evaluar la asociación entre las variables de estudio. Los diseños de Split plot o parcelas divididas se analizaron para cada variedad de grano (AT o BT) utilizando el modelo mixto lineal generalizado en la versión R (R Core Team, 2021). Se incluyó como efecto fijo las interacciones entre el contenido de humedad y el tiempo de almacenamiento. El contenido de humedad (alto, medio y bajo) se consideró por efecto principal y el momento de la cosecha (tiempo 0) y el tiempo de almacenamiento (30, 90 y 180 días) se consideró como Split plot. La significancia se declaró en $P < 0,05$.

6.2.2. Resultados

Se observó la presencia de hongos en 49 de las 50 muestras de sorgo analizadas. Los hongos más frecuentes aislados en muestras frescas y almacenadas correspondieron a *Penicillium* spp. (88%), *Aspergillus* spp. (70%) y *Fusarium* spp. (18%).

Como se muestra en el Cuadro 4, las frecuencias de todos los hongos aumentaron entre el día 0 en los granos recién cosechados hasta el día 30 de almacenamiento y disminuyeron gradualmente a lo largo del tiempo hasta el final del período (día 180); pero solo *Fusarium* mostró una diferencia estadísticamente significativa a lo largo del tiempo ($P = 0,04$).

La distribución de especies dentro de cada género reflejó que una especie era dominante, considerando las muestras recién recolectadas y las almacenadas y varias especies eran raras. Dentro del género *Penicillium*, *P. citrinum* (34%), fue la especie más abundante presente en todas las muestras y *P. verrucosum* (4%) estuvo presente en unas pocas muestras con baja abundancia, otras especies fueron raras.

Como se puede observar en la figura 3, *A. flavus* (60%) fue la especie más abundante de *Aspergillus* y *A. fumigatus* (14%), *A. niger* (14%), *A. candidus* (6,5%) y *A. clavatus* (3,5%) estuvieron presentes con menor abundancia y como especies raras se identificaron *A. ochraceus* (1,1%) y *A. niveus* (0,6%).

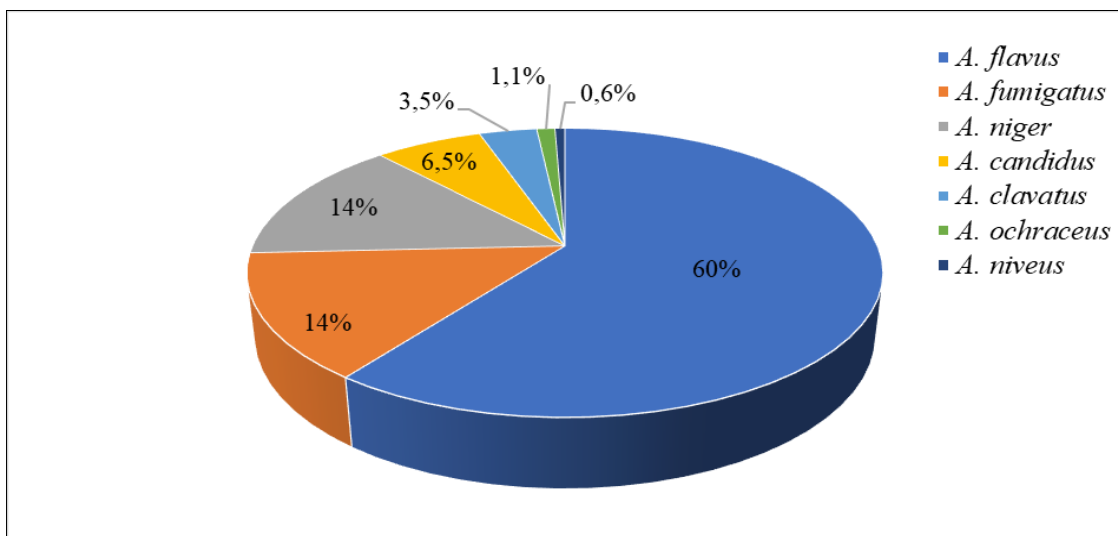


Figura 3. Distribución de especies abundantes y raras de *Aspergillus* en muestras frescas y almacenadas de granos de sorgo.

F. nygamai (68%) fue la especie más abundante de *Fusarium*, con *F. graminearum* (26,4%) presente con menor abundancia y *F. tricinctum* (2,8%) y *F. oxysporum* (1,4%) y *F. semitectum* (1,4%) eran especies raras (Figura 4).

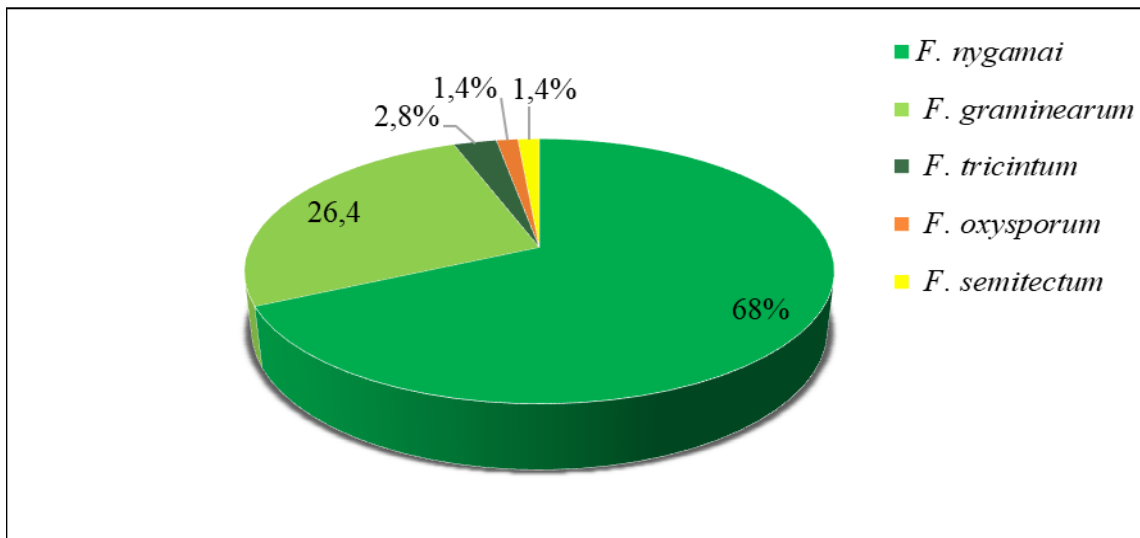


Figura 4. Distribución de especies abundantes y raras de *Fusarium* en muestras frescas y almacenadas de granos de sorgo.

Cuadro 4. Análisis estadístico de la frecuencia relativa de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. en muestras frescas y almacenadas de granos de sorgo.

Variable	<i>Penicillium</i>								<i>Aspergillus</i>								<i>Fusarium</i>							
	Altos taninos				Bajos taninos				Altos taninos				Bajos taninos				Altos taninos			Bajos taninos				
	N	AuN = 7	PrN = 29	P	N	AuN = 1	PrN = 23	P	N	AuN = 11	PrN = 25	P	N	AuN = 4	PrN = 20	N	AuN = 26	PrN = 10	P	N	AuN = 19	PrN = 5	P	
CH (%)	36			>0,9	24				>0,9	36			0,3	24			36			0,5	24			>0,9
Alto	3 (43%)	9 (31%)			0 (0%)	8 (35%)			3 (27%)	9 (36%)			2 (50%)	6 (30%)			10 (38%)	2 (20%)			7 (37%)	1 (20%)		
Medio	2 (29%)	10 (34%)			1 (100%)	7 (30%)			6 (55%)	6 (24%)			1 (25%)	7 (35%)			9 (35%)	3 (30%)			6 (32%)	2 (40%)		
Bajo	2 (29%)	10 (34%)			0 (0%)	8 (35%)			2 (18%)	10 (40%)			1 (25%)	7 (35%)			7 (27%)	5 (50%)			6 (32%)	2 (40%)		
Tiempo (días)	36			0,4	24				>0,9	36			0,1	24						0,04	24			0,11
0	3 (43%)	6 (21%)			0 (0%)	6 (26%)			0 (0%)	9 (36%)			0 (0%)	6 (30%)			3 (12%)	6 (60%)			3 (16%)	3 (60%)		
30	0 (0%)	9 (31%)			1 (100%)	5 (22%)			2 (18%)	7 (28%)			0 (0%)	6 (30%)			7 (27%)	2 (20%)			4 (21%)	2 (40%)		
90	2 (29%)	7 (24%)			0 (0%)	6 (26%)			4 (36%)	5 (20%)			2 (50%)	4 (20%)			8 (31%)	1 (10%)			6 (32%)	0 (0%)		
180	2 (29%)	7 (24%)			0 (0%)	6 (26%)			5 (45%)	4 (16%)			2 (50%)	4 (20%)			8 (31%)	1 (10%)			6 (32%)	0 (0%)		

Estadísticos presentados: N (%); test realizados: Chi-cuadrado y test exacto de Fisher; Au: ausencia; Pr: presencia; CH: contenido humedad, Números en negrita indican diferencias significativas.

En las muestras de granos frescos AT y BT (tiempo 0) la abundancia relativa de *Penicillium* spp. fue menor que en los granos almacenados a los 30, 90 y 180 días con los tres CH (Cuadro 5) evidenciando diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,01$) como se muestra en el Cuadro 6. Pero solo la abundancia relativa de los granos BT con CH medio y bajo evidenció diferencia estadísticamente significativa en relación con los granos con alto CH (Cuadro 6). Si las interacciones de CH y tiempo se consideran estadísticamente significativas, se puede observar una diferencia en abundancia relativa en granos AT con CH medio a los 30 y con CH bajo a los 90 días y en los granos BT con CH medio a los 30 días y con CH bajo a los 30 y 180 días ($P < 0,01$).

Cuadro 5. Análisis de la abundancia relativa de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. en granos frescos (tiempo 0) y ensilados de dos variedades de sorgo.

Variable	<i>Penicillium</i>			<i>Aspergillus</i>			<i>Fusarium</i>		
	Alto CH	Medio CH	Bajo CH	Alto CH	Medio CH	Bajo CH	Alto CH	Medio CH	Bajo CH
Alto tanino									
t0	-	0,11	-	-	0,29	-	-	0,29	-
t30	0,23	0,88	0,2	0,42	0,03	0,28	0	0	0,03
t90	0,55	0,73	0,23	0,05	0,09	0,3	0	0	0,03
t180	0,42	0,58	0,39	0,05	0,08	0,19	0	0,02	0,03
Bajo tanino									
t0	-	0,04	-	-	0,01	-	-	0,14	-
t30	0,37	0,02	0,04	0,21	0,08	0,04	0	0,05	0,13
t90	0,62	0,53	0,18	0,15	0,12	0,35	0	0	0
t180	0,79	0,47	0,47	0,14	0,13	0,07	0	0	0

CH: contenido humedad (%); t: tiempo (días).

La abundancia relativa de *Aspergillus* spp. en muestras frescas AT (tiempo 0) fue mayor que en las muestras almacenadas con los tres CH, excepto a los 30 días con CH alto (Cuadro 5), sin evidencia de diferencia significativa (Cuadro 6). En cambio, en las muestras frescas BT (tiempo 0) la abundancia relativa de *Aspergillus* fue menor que a los 30, 90 y 180 días de tiempo de almacenamiento con CH alto y medio. Pero, en granos con bajo CH a los 180 días fue levemente mayor que en granos frescos cosechados (tiempo 0), sin diferencia significativa. Sin embargo, el efecto del tiempo de almacenamiento evidenció diferencia significativa ($P < 0,01$) en la abundancia relativa de *Aspergillus* presente en granos de ambas variedades. El efecto de los CH sobre la abundancia de *Aspergillus* spp. no tuvo diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 6). Sin embargo, se puede observar una interacción estadísticamente significativa en la abundancia relativa de este género fúngico en los granos AT con CH medio a los 30 días ($P < 0,01$) (Cuadro 7).

La abundancia relativa de *Fusarium* spp. en granos frescos de AT (tiempo 0) fue mayor que en los granos almacenados a los 30, 90 y 180 días (Cuadro 5), evidenciando una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,01$) como se muestra en el Cuadro 6. Por el contrario, el efecto de los CH sobre la abundancia relativa no mostró diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 6). Tampoco se evidenciaron interacciones entre el CH y el tiempo de almacenamiento dentro del género.

Cuadro 6. Análisis estadístico de la abundancia relativa de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. en granos frescos (tiempo 0) y ensilados de dos variedades de sorgo.

Variable	<i>Penicillium</i>						<i>Aspergillus</i>						<i>Fusarium</i>					
	Alto tanino			Bajo tanino			Alto tanino			Bajo tanino			Alto tanino			Bajo tanino		
	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P
CH (%)																		
Alto	—	—		—	—		—	—		—	—		—	—		—	—	
Medio	2	0,70-5,97	0,2	0,2	0,09-0,56	<0,01	0,7	0,48-1,02	0,06	0,4	0,16-1,19	0,11	1	0,51-1,91	>0,9	1,3	0,70-2,21	0,4
Bajo	0,5	0,18-1,51	0,2	0,2	0,09-0,58	<0,01	1,2	0,84-1,67	0,3	0,6	0,21-1,44	0,2	1,4	0,74-2,50	0,3	1,3	0,72-2,15	0,4
Tiempo (d)																		
0	—	—		—	—		—	—		—	—		—	—		—	—	
30	9,3	6,33-13,8	<0,01	2,4	1,21-4,59	<0,01	0,4	0,28-0,53	<0,01	6,4	2,34-17,2	<0,01	0,2	0,11-0,53	<0,01	0,8	0,50-1,38	0,5
90	15	10,0-22,1	<0,01	18	7,81-40,0	<0,01	0,5	0,37-0,75	<0,01	6,7	5,35-52,4	<0,01	0,1	0,05-0,34	<0,01	0	0,00-Inf	>0,9
180	13	8,31-21,2	<0,01	27	13,1-55,1	<0,01	0,3	0,17-0,51	<0,01	5,5	1,67-18,2	<0,01	0,1	0,01-0,50	<0,01	0	0,00-Inf	>0,9

OR: Razón de probabilidad; IC: Intervalo de confianza; CH: Contenido de humedad (%); d: días. Números en negrita indican diferencias significativas.

Cuadro 7. Análisis estadístico de las interacciones entre contenido de humedad y tiempo de almacenamiento sobre las abundancias relativas de *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. de dos variedades de granos de sorgo.

CH * Tiempo	<i>Penicillium</i>						<i>Aspergillus</i>					
	Alto tanino			Bajo tanino			Alto tanino			Bajo tanino		
	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P	OR	95% IC	P
Medio CH * t30	31,5	8,99-110	<0,01	0,02	0,00-0,15	<0,01	0,04	0,01-0,16	<0,01	0,22	0,02-2,02	0,2
Bajo CH * t30	1,26	0,45-3,54	0,7	0,12	0,03-0,53	<0,01	0,49	0,21-1,12	0,09	0,24	0,02-2,31	0,2
Medio CH * t90	3,03	0,91-10,0	0,07	0,64	0,10-4,15	0,6	3,24	0,82-12,9	0,09	0,69	0,04-12,7	0,8
Bajo CH * t90	0,12	0,05-0,34	<0,01	0,17	0,02-1,32	0,09	3,31	1,00-11,0	0,05	4,79	0,31-73,3	0,3
Medio CH * t180	3,02	0,71-12,8	0,13	0,22	0,04-1,30	0,1	2,4	0,24-24,2	0,5	0,95	0,06-14,4	>0,9
Bajo CH * t180	0,7	0,18-2,64	0,6	0,15	0,03-0,76	<0,01	5,4	0,59-49,2	0,13	0,31	0,02-4,55	0,4

OR: Razón de probabilidad; IC: Intervalo de Confianza; CH: Contenido de Humedad (%); t: Tiempo en días. Números en negrita indican diferencias significativas.

Sólo se detectó aflatoxinas totales en cuatro de las 50 muestras (8%), una de las muestras recién recolectada (tiempo 0) y las otras tres de las muestras almacenadas.

En la muestra de AT recién recolectada (tiempo 0) se detectó 6,7 µg/kg de AF totales y 2 µg/kg de AFB₁. En las tres muestras almacenadas: 1) en una BT con alto CH en el día 90 se detectaron 20 µg/kg y no se detectó AFB₁; 2) en otra BT con CH medio en el día 180 se detectó AF 14 µg/kg y también AFB₁ 14 µg/kg; 3) en una AT con CH bajo en el día 180, se detectó 28,8 µg/kg, pero no se detectó AFB₁.

La fumonisina se detectó en dos muestras recién recolectadas contaminadas con *Fusarium* que produjeron niveles que variaron de 500 µg/kg en granos AT a 900 µg/kg en granos BT, pero no se detectó en ninguna muestra almacenada.

6.3. Evaluación de la fermentación ruminal *in vitro* en silos experimentales

La incorporación del ensilaje de granos húmedos de sorgo en los sistemas ganaderos ha sido una buena herramienta de intensificación tecnológica. El aumento de la humedad del grano y el procesamiento físico, logran mejorar la digestión del sorgo en los rumiantes, alternativa interesante sobre todo cuando se trata de materiales con nivel alto de taninos. Es sabido, por otra parte, que el nivel de humedad presente en el grano impacta sobre el proceso de fermentación durante el ensilaje. Existen resultados divergentes en la bibliografía consultada, la digestibilidad de granos de sorgo ensilados con altas concentraciones de taninos condensados con los que presentan bajas concentraciones. Por este motivo, y considerando que la digestibilidad de los granos depende en gran medida de su fermentación en rumen, el objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de variedades altas y bajas en taninos de granos de sorgos ensilados con diferentes humedades, evaluados en distintos momentos del ensilaje, sobre los parámetros de fermentación *in vitro*.

6.3.1. Materiales y métodos

Se obtuvieron las muestras al momento de la cosecha, de los mismos establecimientos del estudio de hongos toxicogénicos y micotoxinas. Se realizaron por triplicado silos experimentales en condiciones de laboratorio como se indica en la sección 6.2.1. Para este estudio el total de silos experimentales fue: 5 establecimientos (3 AT y 2 BT) x 27 silos (3 de cada rango de humedad x 3 tiempos de almacenamiento x 3 réplicas) = 135.

La composición química y los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* de los granos de sorgo antes del proceso de ensilaje se corresponde con el cuadro 1, sección 6.1.1. El procedimiento realizado y la técnica de producción de gas *in vitro* fueron los mismos que en el estudio de campo indicado en la sección 6.1.1.

Análisis estadístico

La cinética de fermentación *in vitro* se analizó mediante el procedimiento MIXED de SAS (versión 9,0) de acuerdo con el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + T_j + H_h + (V*T)_{ij} + (V*H)_{ih} + (T*H)_{jh} + (V*T*H)_{ijh} + \epsilon_{ijk}$$

Donde Y es la variable en estudio, μ es la media general, V_i es el efecto fijo de la variedad de sorgo i (i = alto o bajo taninos), T_j es el efecto fijo del tiempo de almacenamiento de los silos (j = 30, 90 y 180 días) y se consideró H_h el efecto fijo de humedad h (alta, media y baja), $(V*T)_{ij}$ es la interacción entre variedad i y tiempo de almacenamiento j , $(V*H)_{ih}$ es la interacción entre variedad i y la humedad h , $(T*H)_{jh}$ es la interacción entre tiempo de almacenamiento j y la humedad h , $(V*T*H)_{ijh}$ es la interacción de las tres variables entre sí, variedad i , tiempo de almacenamiento j y la humedad h ; y ϵ_{ijk} es el error residual. El efecto del silo se incluyó como aleatorio. La significancia se declaró en $P < 0,05$.

6.3.2. Resultados

El volumen de gas fue afectado por la variedad de sorgo, como se puede observar en el cuadro 8, los granos BT produjeron más volumen que los AT ($P < 0,001$), independientemente del tiempo de almacenamiento y del contenido de humedad de los granos. Se puede ver una interacción significativa entre el tiempo de almacenamiento y el CH ($P < 0,05$). Los valores de producción potencial de gas (a) fueron mayores a los 30 días de almacenamiento en relación con los de 180 días ($P < 0,05$) en aquellas muestras con CH medio y a los 30 y 90 días, también fueron superiores los valores de CH medio con respecto a los de CH alto ($P < 0,05$). Los granos de sorgo ensilados con un rango de humedad media disminuyeron 30 mL de gas/g de MS incubada entre el día 30 y el día 180 de almacenamiento ($P < 0,05$) (figura 5). La tasa fraccional de producción de gas (kd), fue mayor en las muestras con CH bajo, al comparar los tiempos 30 y 180 ($P = 0,002$). En las muestras con CH medio, también tuvieron una mayor kd ($P < 0,05$) a los 180 días en comparación con 30 y 90 días. Las muestras con humedad alta no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$). Al evaluar las muestras con CH medio se observó que la kd fue mayor para las variedades AT en comparación con las BT ($P < 0,05$). En las muestras BT la kd mostró mayores valores con CH alto en relación con las otras humedades. El tiempo de latencia (L) presentó interacciones significativas entre la variedad y el nivel de humedad. Se vio diferencia significativa ($P < 0,05$) entre las variedades AT y BT, siendo mayor el valor de L en las BT, al evaluar las muestras con CH medio.

Cuadro 8. Efectos de las variedades, de los contenidos de humedad (bajo, medio y alto) y de los diferentes tiempos de almacenamiento (30, 90 y 180 días) sobre los parámetros de producción de gas in vitro de granos de sorgos ensilados.

Parametro	Variedad				Contenido humedad					Tiempo almacenamiento					P V*T	P V*H	P T*H	P V*T*H
	HT	LT	SEM	P	L	M	H	SEM	P	30	90	180	EEM	P				
a	223	260	4,64	<,001	234	248	243	5,71	0,21	241	243	240	5,71	0,89	0,67	0,06	0,03	0,63
kd	0,092	0,099	0,002	0,49	0,096	0,09	0,088	0,002	<,01	0,087	0,089	0,098	0,002	<,001	0,47	0,007	0,002	0,86
L	2,81	2,75	0,04	0,36	2,73	2,76	2,71	0,04	0,73	2,72	2,73	2,75	0,04	0,82	0,54	0,01	0,05	0,86

a: producción potencial de gas (ml de gas/g MS incubada); kd: tasa fraccional de producción de gas (h-1); L: tiempo de latencia de la producción de gas (h); AT: variedad de sorgo alto tanino; BT: variedad de sorgo bajo tanino; 30, 90 y 180 días de almacenado; EEM: error estándar de las medias. P: nivel de significancia de la variedad, contenido de humedad, tiempo de almacenamiento, interacción variedad por tiempo de almacenamiento, interacción variedad por contenido de humedad, interacción entre tiempo de almacenamiento contenido de humedad y la interacción entre variedad, tiempo de almacenamiento y contenido de humedad. Números en negrita indican diferencias significativas.

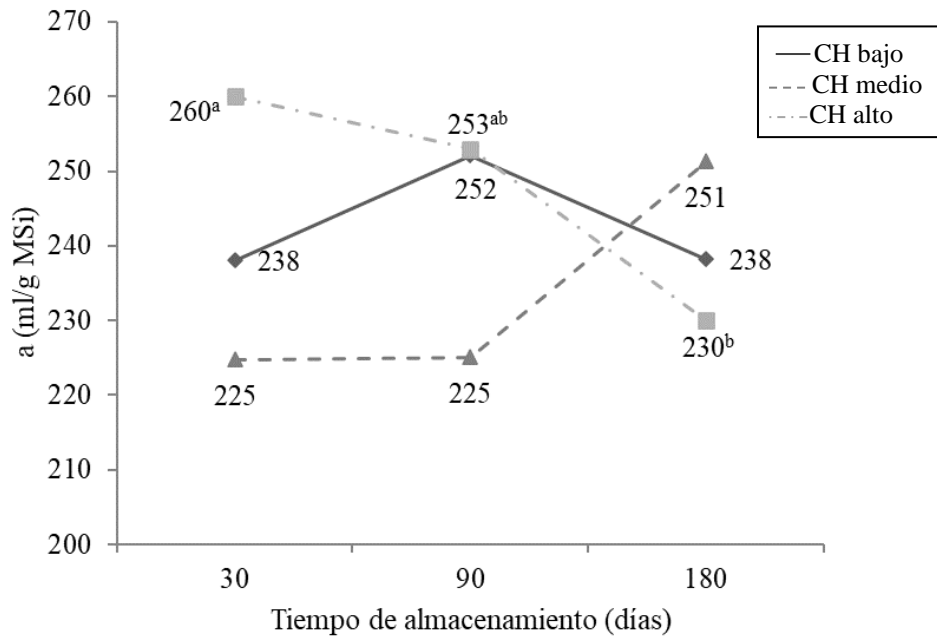


Figura 5. Efecto de los contenidos de humedad (CH: bajo, medio y alto) y tiempo de almacenamiento (30, 90 y 180 días) sobre la producción de gas (a). (Letras distintas indican diferencia significativa dentro del mismo rango de humedad).

En la tasa de producción de gas se observaron interacciones entre la variedad y el CH ($P=0,007$) y entre tiempo de almacenamiento y CH ($P=0,002$). En la figura 6 se muestra el efecto del tiempo de almacenamiento según el CH del grano, presentando los sorgos ensilados con CH bajo y medio, mayores velocidades de fermentación a los 180 días de almacenamiento en relación con 30 y 90 días.

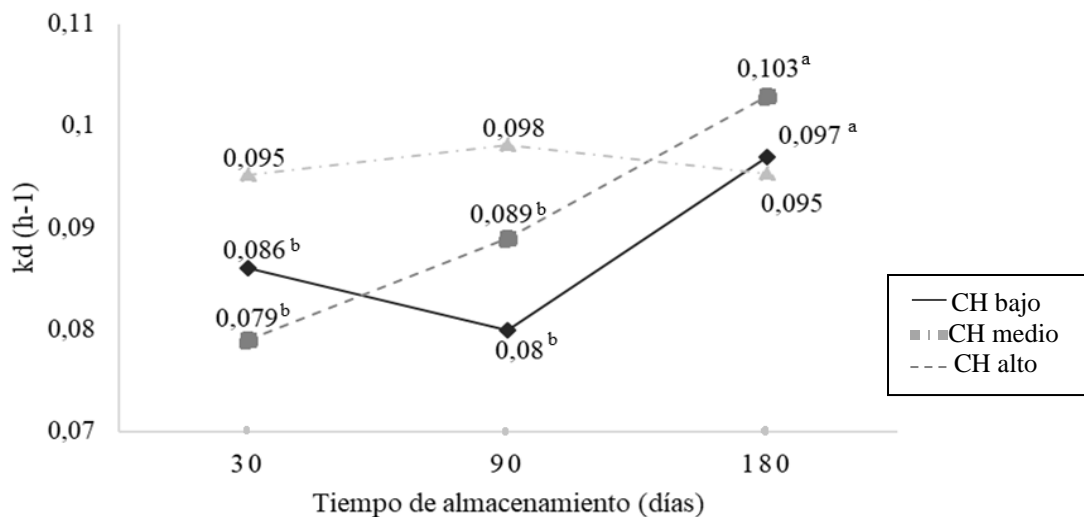


Figura 6. Efecto del contenido de humedad (bajo, medio y alto) y el tiempo de almacenamiento (30, 90 y 180 días) sobre la tasa fraccional de producción de gas (kd). Letras distintas indican diferencia significativa dentro del mismo rango de humedad.

En la figura 7, se puede observar que los granos de sorgo BT fermentaron más rápido cuando fueron ensilados con humedad alta, mientras que los sorgos AT con humedad media presentaron mayor tasa de producción de gas que con humedad baja.

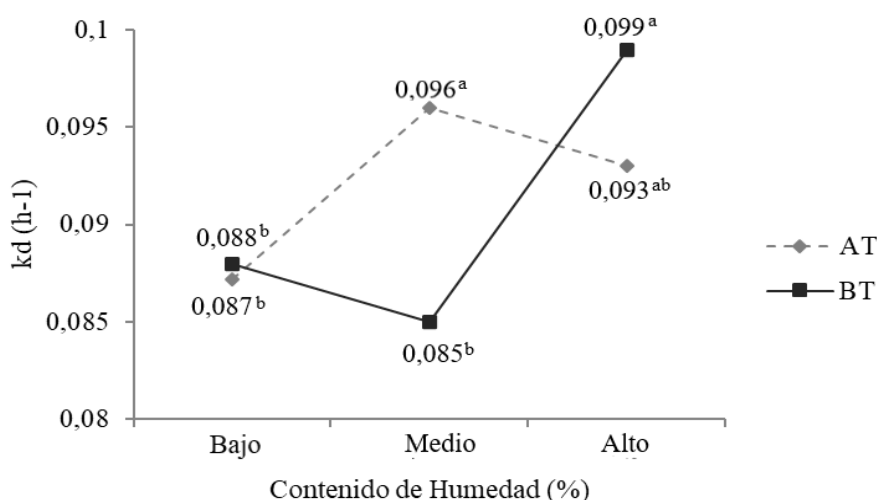


Figura 7. Efecto del contenido de humedad (bajo, medio y alto) sobre la tasa fraccional de producción de gas (kd) de granos de sorgo de variedades con concentraciones altas (AT) o bajas (BT) de taninos. Letras distintas indican diferencia significativa dentro de la variedad.

El tiempo de latencia (L) no se modificó a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, pero presentó una interacción significativa entre la variedad y el contenido de humedad del grano. Los sorgos BT ensilados con humedad media presentaron mayor tiempo de latencia que los ensilados con humedad baja (figura 8).

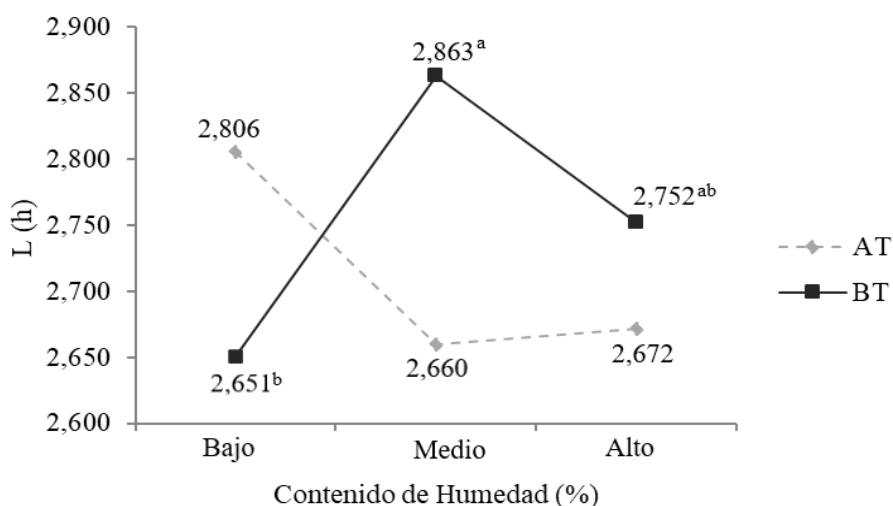


Figura 8. Efecto del contenido de humedad (bajo, medio y alto) sobre el tiempo de latencia (L) de granos de sorgo de variedades con concentraciones altas (AT) o bajas (BT) en taninos. Letras distintas indican diferencia significativa dentro de la misma variedad.

7. DISCUSIÓN GENERAL

El estudio realizado permitió evaluar en condiciones de campo y de laboratorio el efecto de la variedad, contenido de humedad y tiempo de almacenamiento de granos de sorgo ensilados húmedos sobre las poblaciones de hongos toxicogénicos y micotoxinas y la producción de gas *in vitro*. En el estudio experimental de campo, se evaluó además de lo planteado en el objetivo general, el efecto sobre la composición química de los granos de sorgo al momento del ensilaje y almacenados en silo bolsas. En este estudio, se vio que, si bien el efecto de la variedad fue evidente solo para algunos componentes químicos, el tiempo de almacenamiento afectó a todos los parámetros de composición química de los silos, a excepción del contenido FNDA.

Tanto el efecto de la fermentación como el del tiempo de almacenamiento, disminuyeron las concentraciones de TC, este efecto fue más evidente en sorgos AT que en BT. El efecto de la fermentación en el ensilaje para reducir el contenido de taninos del sorgo ha sido previamente reportado en otros estudios (Patrício *et al.*, 2006; Gollcher *et al.*, 2010; Aguerre *et al.*, 2015). Esta disminución en las concentraciones de TC puede estar relacionada con el ambiente ácido y la actividad microbiana anaeróbica dentro del silo, inactivando los TC, que son despolimerizados a compuestos de bajo peso molecular en medios ácidos (Lopes *et al.*, 2017). Este es un efecto beneficioso ya que la inactivación de los TC mejora la utilización digestiva de los granos de sorgo (Mitaru *et al.*, 1984; Aguerre *et al.*, 2015). De hecho, en este estudio, los granos fermentados tuvieron un menor tiempo de demora y produjeron gas más rápido, en comparación con los granos antes de ensilar. La variedad de sorgo afectó el volumen de producción de gas.

Según resultados de otros estudios, la fermentabilidad de granos de sorgo de las variedades BT es mayor que la de las variedades AT (Hibberd *et al.*, 1982; Gemeda & Hasen, 2015), ya que los taninos disminuyen la fermentabilidad de los piensos. Sorprendentemente, en nuestro estudio, el volumen y la tasa de producción de gas fue mayor en la variedad AT que en la BT, incluso antes de ensilar (día 0). Este efecto no se esperaba, considerando que la variedad AT tenía menor contenido de almidón y mayor contenido de fibra neutro y ácido-detergente que los granos BT antes del ensilaje. Probablemente, las características de los componentes no evaluados en este estudio, como la relación amilosa-amilopectina, podría explicar estas diferencias. La velocidad de fermentación también se vio influenciada por el tiempo de almacenamiento. Un mayor tiempo de almacenamiento favoreció la tasa de producción de gas observada, lo que puede estar relacionado con velocidades más altas de fermentación ruminal y crecimiento microbiano. Estos resultados sugieren que el proceso de ensilaje podría producir una mayor disponibilidad de sustratos que la observada en los granos no fermentados. Resultados similares se vieron en estudios en donde evaluaron la producción de gas *in vitro* de granos de sorgo fermentados (Aguerre *et al.*, 2015).

Cummins (1971) reportó que el aumento en la digestibilidad *in vitro* de MS de ensilajes de sorgo fue mayor en los híbridos con altas concentraciones de taninos que en los que tenían bajas concentraciones de taninos. En nuestro estudio, no se evaluó la digestibilidad de los granos, pero no se detectaron interacciones entre los granos BT y AT en la fermentación *in vitro*. Este resultado podría indicar que la diferencia observada en la tasa de fermentación se explicaría por el efecto del ensilaje y no por los taninos.

Las poblaciones totales de hongos y toxicogénicos se vieron afectadas por el proceso de fermentación y el tiempo de almacenamiento. Las poblaciones de *Penicillium* spp. aumentaron con el tiempo de almacenamiento, siendo más evidente en los granos BT. Sin embargo, las poblaciones de *Aspergillus* spp. disminuyen con el almacenamiento en ambas variedades de granos. *Aspergillus* y *Penicillium* son los principales hongos toxicogénicos contaminantes durante el almacenamiento. Además, algunas especies de *Aspergillus* pueden encontrarse antes de la cosecha (Scudamore & Livesey, 1998). A medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, se observó una disminución en las poblaciones de *Fusarium*. Teniendo en cuenta las características de fermentación y el tiempo de almacenamiento de los granos, parecería que el tiempo de almacenamiento óptimo sería de 180 días, sin embargo, en este estudio, el momento óptimo para las poblaciones fúngicas fue de 90 días. Las poblaciones de hongos totales y de *Fusarium* spp. se correlacionaron positivamente con MS, almidón, PC y pH. En general, un nivel alto de humedad en los granos favorece el proceso de ensilaje, ya que hay mayor producción de ácidos orgánicos, lo que disminuye el crecimiento de hongos dentro del silo (Baron *et al.*, 1986).

Los valores de pH disminuyeron y se mantuvieron en un rango esperado para los granos de sorgo para ensilaje húmedo. Rowe *et al.* (1999) afirman que el ácido láctico producido en los granos almacenados, en las condiciones de anaerobiosis del ensilaje, reduce el pH y, por lo tanto, ayuda a preservar la calidad de los granos. El hecho de que las poblaciones de *Fusarium* y *Penicillium* fueran correlacionadas negativamente con las concentraciones de TC indicaría que concentraciones altas de taninos en los granos de sorgo reducen la contaminación por hongos. Esto no se observó en las poblaciones de *Aspergillus*, probablemente debido a la alta contaminación de este género antes del ensilaje. En este sentido, una de las ventajas agronómicas de los granos de sorgo AT está dada por el efecto protector de estos compuestos contra la contaminación por hongos (Harris & Burns, 1973; Waniska, 2000). La presencia de taninos condensados en combinación con ácidos fenólicos y flavan-4-oles sería responsable de la resistencia a los hongos en granos maduros (Jambunatham *et al.*, 1992; Menkir *et al.*, 1996). Otros estudios, consideran que la resistencia a la contaminación por hongos en los granos de sorgo está relacionada con las variedades AT y BT (Bandyopadhyay *et al.*, 1988; Jambunatham *et al.*, 1992).

En el segundo estudio experimental, los resultados mostraron diferencias significativas entre granos recién cosechados y granos almacenados con diferente contenido de humedad y tiempos de almacenamiento en cuanto a la abundancia de los hongos toxicogénicos más importantes. Solo la abundancia de la población de *Penicillium* en los granos BT se vio afectada por el contenido de humedad, donde hubo una disminución de este género en granos con CH medio y bajo en relación con los de CH alto. Por otro lado, el tiempo de almacenamiento favoreció el aumento de la población de *Penicillium*, en cambio, disminuyeron las poblaciones de *Aspergillus* y *Fusarium*. En un estudio anterior, se encontró que para los granos húmedos de sorgo almacenados en silo-bolsas durante 180 días, el ensilaje fue beneficioso ya que disminuyeron las tres poblaciones de hongos toxicogénicos, particularmente en granos BT (García y Santos *et al.*, 2020).

La principal contaminación fúngica de los granos de sorgo fue cualitativamente comparable a la encontrada en otros países productores de sorgo en todo el mundo (Leslie, 2014). Sin embargo, no se pudo establecer una comparación cuantitativa similar, ya que no se realizan con frecuencia estudios que investiguen las contaminaciones fúngicas de los granos de sorgo almacenados durante un período prolongado de 180 días. Los hongos de granos de trigo con seis meses de almacenamiento mostraron la presencia de *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. al igual que se registró en nuestro estudio (Sinha, 1993; Birk *et al.*, 2006). Estos hongos se encuentran asociados con semillas de cereales y plantas en crecimiento desde el momento en que se siembran las semillas, y pasan a formar parte del agroecosistema hasta el momento en que las nuevas semillas se cosechan, transportan y almacenan como parte de un nuevo ecosistema de granos (Sreenivasa *et al.*, 2010). La presencia y magnitud de la contaminación por hongos varían con las condiciones bajo las cuales transcurren esas etapas (Osman *et al.*, 2017).

En los granos de sorgo analizados en este estudio, *Penicillium* fue favorecido en granos AT y BT bajo condiciones de almacenamiento y *Aspergillus* en granos frescos recién cosechados más en AT que en BT. Por lo tanto, es importante tener en cuenta la cantidad de precipitación en la temporada de cultivo pues incidirá en la humedad de los granos en el momento de la cosecha (González *et al.*, 1997).

Es probable que, los niveles de AF bajos en las muestras de granos frescos estuvieran relacionados con los valores de lluvia durante el período de crecimiento. En los granos almacenados, las AFs estuvieron ausentes o se detectaron en pocas muestras en niveles bajos, siendo más bajas aun en las muestras con CH medio, similar a los granos en las muestras frescas y más altas en aquellas con CH bajo o alto. Por el contrario, Magan & Aldred (2008) encontraron que en condiciones de ensilaje los granos con bajo contenido de agua eran los más aptos para un almacenamiento seguro. Weledesemayat *et al.* (2016) detectaron AFB₁ (2,26 µg/kg) en granos de sorgo con bajo CH. Por el contrario, Montani *et al.* (1988) mostraron que la condición más favorable para la producción de AFB₁ en granos de maíz era con un CH medio para todos los tiempos de incubación.

Por su parte Lahouar *et al.* (2018) encontraron que la producción de AFB₁ podría evitarse almacenando granos de sorgo con bajo contenido de agua, si bien los niveles más altos se produjeron con el mayor contenido de agua. La comparación del porcentaje de CH de los granos de sorgo con la actividad del agua de otros granos se calculó aproximadamente de acuerdo con los valores mostrados por Magan *et al.* (2014). Estos resultados contradictorios probablemente se deben a diferentes condiciones durante el período de crecimiento del sorgo y en el momento del muestreo.

Uruguay sigue los límites determinados por la legislación común de los países que integran el MERCOSUR, donde el límite máximo de aflatoxinas permitido es de 20 µg/kg para el maíz destinado al consumo de vacas lecheras (MERCOSUR, GMC/RES. No.25/02). Además, el MGAP recomienda el límite máximo de 5 µg/kg de AFB₁ en las dietas destinadas a las vacas lecheras, como lo indica el reglamento de la Unión Europea (European Commission, 2002/32/EC, 2002). Dado que los granos almacenados son una de las principales fuentes de nutrición de las vacas lecheras en Uruguay, la aflatoxicosis representa un riesgo para la salud animal considerando los severos signos clínicos sobre la salud animal, la producción de leche y la conversión alimenticia (Whitlow & Hagler, 2005; Sulzberger *et al.*, 2017). Sin embargo, el impacto más importante en la salud humana se debe a la transformación metabólica de AFB₁ en AFM₁, metabolito presente en la leche (Stoloff, 1980; Veldman *et al.*, 1992).

Las fumonisinas producidas por *F. nygamai* solo se detectaron en dos muestras recién cosechadas de granos AT y BT, lo que corresponde a la escasa presencia o ausencia de *F. nygamai* en los granos ensilados. Según Da Silva *et al.* (2004), los niveles de AF y fumonisinas detectados en granos de sorgo cosechados frescos y ensilados dependen de los factores abióticos predominantes (contenido de humedad, temperatura, humedad relativa y precipitación media) durante el período de crecimiento del sorgo y en el momento del muestreo.

Parece probable que, aparte de las condiciones ambientales durante la precosecha y el almacenamiento de los granos, no se deban descartar las interacciones durante el almacenamiento con el contenido de taninos sobre la abundancia de los hongos. Los taninos son recursos recalcitrantes para la biodegradación, principalmente debido a la capacidad de estas moléculas para inhibir el crecimiento microbiano al unirse fuertemente a proteínas y polisacáridos como la celulosa y la pectina (Bhat *et al.*, 1998). Los taninos condensados son más resistentes a la descomposición microbiana, mientras que los taninos hidrolizables son degradados más fácilmente por algunos microorganismos (Cruz-Hernández *et al.*, 2005). Por otra parte, las especies *Aspergillus* y *Penicillium* son los microorganismos más activos capaces de producir tanasa (Abdel-Naby *et al.*, 2011). En la alimentación animal, la tanasa se usa para reducir los efectos anti nutricionales de los taninos y para mejorar la actividad de digestibilidad animal que logran estos hongos (Aguilar *et al.*, 2007; Graminha *et al.*, 2008; Murugan & Al-Sohaibani, 2010).

Si bien los resultados de este estudio han demostrado que pocas muestras estaban contaminadas con niveles bajos de micotoxinas, se debe realizar un monitoreo periódico del ensilaje de sorgo para evitar el deterioro en la producción animal y los peligros para la salud humana (Keller *et al.*, 2012). Además, como los granos de sorgo son un recurso muy importante en Uruguay, es necesaria una legislación que regule los límites máximos de aceptación para su comercialización (Astoreca *et al.*, 2019).

En resumen, ha sido posible mostrar que las diferencias en la abundancia relativa de *Penicillium* spp., evidencia que las condiciones de almacenamiento favorecieron la colonización del grano en relación con el grano fresco. En cambio, las poblaciones de *Fusarium* spp. fueron desfavorecidas, ya que la colonización después de 30 días de ensilaje disminuyó la abundancia relativa. La abundancia de *Aspergillus* spp. en granos AT disminuyó con el tiempo de almacenamiento. Si bien, se detectó una baja contaminación por hongos toxicogénicos y bajos niveles de micotoxinas, se sugiere realizar un monitoreo del ensilaje de sorgo a fin de evaluar la evolución de la población de hongos y la producción de micotoxinas.

En el tercer estudio experimental, los resultados muestran que el volumen total de gas producido fue mayor para las variedades BT en comparación con las AT. Sin embargo, estos mismos granos ensilados en condiciones de campo, mostraron mayor volumen de gas producido en las variedades AT. Probablemente, las características de los componentes no evaluados en ese estudio, como la relación amilosa-amilopectina, podría explicar la mayor producción de gas en los granos AT (García y Santos, *et al.*, 2020).

Por otra parte, los estudios *in vitro* permiten evaluar el efecto de parámetros que afectan los procesos que tienen lugar durante la fermentación de los granos en los silos. En cambio, es difícil evidenciar algunos de estos efectos en las condiciones de fermentación de silos de campo.

Otros estudios también reportaron una fermentación ruminal superior en granos de sorgo BT en comparación con granos AT (Hibberd *et al.*, 1982; Hibberd *et al.*, 1985; Curbelo, 2010). Los taninos en el sorgo forman complejos indigestibles con proteínas y almidón por lo que influyen negativamente al disminuir la digestibilidad de estos granos (Makkar, 2003). A su vez, la disposición y características de la matriz de proteínas que recubren a los gránulos de almidón, influyen sobre la solubilidad y fermentación de estas proteínas (Van Barneveld, 1999). La matriz proteica asociada con los gránulos de almidón, la presencia de TC (Huntington, 1997, Offner *et al.*, 2003) y la mayor proporción de endospermo córneo, que hace que el almidón sea de menor digestibilidad, hacen que los granos de sorgo sean considerados de menor valor nutritivo que otros granos de cereales (Rooney & Pflugfelder, 1986).

En las condiciones en que se realizó este trabajo, si bien el volumen de gas disminuyó con el transcurso del tiempo en las muestras con CH medio, la velocidad de degradación aumentó en las muestras con CH bajo y medio. Lo esperable hubiera sido que el volumen de gas aumentara a mayor tiempo de almacenamiento, ya que se ha observado que dicho proceso tiene un efecto positivo sobre el volumen de gas producido en granos de sorgo (Curbelo, 2010). En cambio, observamos que un mayor tiempo de almacenamiento de los granos de sorgo, incrementó la velocidad de degradación mejorando el comportamiento de estos. En estos granos evaluados en silos de campo, también la velocidad de fermentación se vio favorecida por un mayor tiempo de almacenamiento (García y Santos *et al.*, 2020). Estudios comparando granos de sorgo, trigo, cebada y maíz, encontraron que el sorgo si bien llegaba a producir un volumen de gas total similar a los otros granos, la velocidad de degradación era la más lenta (Lanzas *et al.*, 2007).

En este estudio, la mayor velocidad de degradación se vio en los granos BT con CH alto, y en los AT con CH medio y alto. Esto podría deberse a que la humedad incrementa la degradación ruminal del almidón, lo que hace que la solubilización de la matriz proteica aumente la susceptibilidad de los gránulos de almidón a la hidrólisis enzimática (Hibberd *et al.*, 1985). En cambio, cuando el material es ensilado con bajo CH, la compactación no es buena, se forman espacios de aire en las bolsas, lo que conlleva una pérdida de nutrientes por la fermentación aeróbica que aparece (Rovira & Velazco, 2012). Esto último podría explicar la menor velocidad de degradación de los granos con CH bajo, independientemente de la variedad de grano utilizada. La humedad favorece la digestibilidad de los granos de sorgo independientemente del proceso de ensilaje. Esto explicaría porque las muestras con CH alto evidenciaron una alta tasa de degradación a los 30 días del almacenamiento. En cambio, las muestras con CH medio y bajo necesitaron mayor tiempo de almacenamiento para mejorar la velocidad de producción de gas. Huck *et al.* (1999) demostraron que la reconstitución de granos de sorgo secos (hasta llegar a una humedad final de 25-35 %) mejoró la digestibilidad de estos, asociado a una mayor digestión del almidón, sugiriendo que humedades superiores a 30%, podrían favorecer las características fermentativas y de digestibilidad en los rumiantes.

Al contrario de lo esperado, el tiempo de latencia aumentó en las variedades BT con CH medio, en comparación con el CH bajo, aunque si bien hubo diferencia estadística, la diferencia numérica fue menor de 13 minutos. Por otro lado, en granos AT no hubo variaciones entre los diferentes CH y fue menor en comparación con los granos BT. Lo esperable hubiera sido una más rápida adhesión de los microorganismos en granos de sorgo con una estructura de los gránulos de almidón y de la matriz proteica menos compleja, como ocurriría en los BT. Habría que realizar nuevos trabajos en esta línea para poder estudiar este efecto y encontrar una explicación al mismo.

Reichert *et al.* (1980), observaron que el almacenamiento de granos de sorgo húmedos altos en taninos en condiciones de anaerobiosis, desactiva los taninos, mejorando el valor nutricional de estos granos. Este efecto del ensilaje sobre los taninos ayudaría a explicar los resultados de este trabajo.

En términos generales, puede decirse que la fermentación del ensilaje redujo la concentración de taninos condensados en el grano de sorgo y redujo poblaciones fúngicas, y que la acción aumentó con el tiempo de almacenamiento. Asimismo, los granos de sorgo con menor contenido en taninos tuvieron una fermentación ruminal más extensa, y tanto la humedad del ensilaje como el tiempo de almacenamiento favorecieron la magnitud de la fermentación ruminal.

8. CONCLUSIONES GENERALES

El tiempo de almacenamiento durante 180 días de granos de sorgo húmedos conservados en silo-bolsas, fue beneficioso al reducir la concentración de taninos condensados, aumentando la velocidad de fermentación de los granos y minimizando la contaminación fúngica, tanto en variedades altas como bajas en taninos. Este tiempo de almacenamiento sería ideal para mejorar la utilización ruminal de los granos, aunque 90 días de almacenamiento fueron óptimos para minimizar la contaminación de las especies de hongos toxicogénicos evaluadas.

Las condiciones experimentales de laboratorio evidenciaron una baja contaminación por hongos toxicogénicos y bajos niveles de micotoxinas. La colonización de *Penicillium* spp. se vio favorecida en los granos almacenados en relación con los granos frescos antes del ensilaje. En cambio, las poblaciones de *Fusarium* spp. disminuyeron después de los 30 días de almacenamiento lo mismo que las de *Aspergillus* spp. en granos con alto contenido de taninos. Estos resultados sugieren la importancia de realizar un monitoreo periódico del ensilaje de sorgo en diferentes momentos de acuerdo con la evolución de la población de hongos y la producción de micotoxinas.

Los granos de sorgo con bajas concentraciones de taninos produjeron mayor volumen de gas. Los sorgos altos en taninos tuvieron una mejor fermentación ruminal con un contenido de humedad medio, en cambio, los granos bajos en taninos fermentaron más con humedad alta. Tanto los granos de sorgo altos como los bajos en taninos que fueron evaluados mostraron mejor fermentación ruminal con un mayor tiempo de almacenamiento.

El contenido de humedad que presentaron los granos frescos no afectó cuantitativamente a las poblaciones fúngicas de manera significativa, pero sí afectó la producción de gas según la concentración de taninos condensados de los granos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Naby, M., Sherief, A.A., El-Tanash, A.B., 2011. Tannin Biodegradation and Some Factors Affecting Tannase Production by Two *Aspergillus* sp. *Biotechnology (Faisalabad)*. 10:149-158. <https://dx.doi.org/10.3923/biotech.2011.149.158>

Abildgren, M.P., Lund, F., Thrane, U., Elmholt, S., 1987. Czapek Dox agar containing iprodione and dicloran as a selective medium for the isolation of *Fusarium* species. *Lett. Appl. Microbiol.* 5:83-86. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1987.tb01620.x>

Aguerre, M., Cajarville, C., Repetto, J.L., 2015. Impact of water addition, germination, ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.* 205, 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.016>

Aguilar, C.N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E. Prado-Barragán, L.A., Ramírez-Coronel, A., Contreras-Esquivel, J.C., 2007. Microbial tannases: Advances and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:47-59. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2>

Ahmad Dar, R.A., Ahmad Dar, E., Kaur, A., Gupta Phutela, U., 2018. Sweet sorghum-a promising alternative feedstock for biofuel production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 82:4070-4090. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.066>

Alonso, V., Pereyra, C., Keller, L., Dalcero, A., Rosa, C., Chiacchiera, S., Cavaglieri, L., 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J. Appl. Microbiol.* 115:637-643. <https://doi.org/10.1111/jam.12178>

Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D.M., 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *J. Gen. Plant Pathol.* 80:189-201. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>

Association of Official Analytical Chemists. 1997. *Methods of Analysis*, 16th ed, 3rd revision, Gaithersburg, MD, USA.

Association of Official Analytical Chemists. 2000. *Methods of Analysis* 925.10, 65.17, 974.24, 17th ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

Association of Official Analytical Chemists. 2002. *Method of Analysis* 991.3 1994, Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut. Disponible en: http://www.aocofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=1723

Astoreca, A.L., Emateguy, L.G., Alconada, T.M., 2019. Fungal contamination and mycotoxins associated with sorghum crop: its relevance today. *Eur. J. Plant. Pathol.* 155:381-392. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-019-01797-w>

Auerbach, H., Oldenburg, E., Weissbach, F., 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *J. Sci. Food Agric.* 76:565-572. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199804\)76:43.0.CO;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199804)76:43.0.CO;2-6)

Balogun, R.O., Rowe, J.B., Bird, S.H., 2005. Fermentability and degradability of sorghum grain following soaking, aerobic or anaerobic treatment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120:141-150. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.01.005>

Bandyopadhyay, R., Mughog, L.K., Prasada Rao, K.E., 1988. Sources of resistance to sorghum grain molds. *Plant Dis.* 72:504-508.

https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1988Articles/PlantDisease72n06_504.PDF

Barnes, F.R., Nelson, J.C., Collins, M., Kenneth, J.M., 2003. Forages: the science of grassland agriculture, Volumen 2. 6a.ed. Iowa. Blackwell, 556 p.

Baron, V.S., Stevenson, K.R., Buchanan-Smith, J.G. 1986. Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. *Can. J. Anim. Sci.* 66:451-461; <https://doi.org/10.4141/cjas86-047>

Bean, S.R., Zhu, L., Smith, B.M., Wilson, J.D., Ioerger, B.P., Tilley, M., 2019. Starch and Protein Chemistry and Functional Properties, in: *Sorghum and Millets*. Elsevier, pp. 131-170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00006-X>

Bhat, T.K., Singh, B., Sharma, P.O., 1998. Microbial degradation of tannins a current perspective. *Biodegradation.* 9:343-357. <https://doi.org/10.1023/A:1008397506963>

Birck, N.M.M., Lorini, I., Scussel, V.M., 2006. Fungus and mycotoxins in wheat grain at postharvest. *Proc. Int. Work. Conf. Stored Prod. Protection.* 9. Disponible en: <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwcsspp/pdf2/9/6281.pdf>

Blakely, M.E., Rooney, L.W., Sullins, R.D., Miller, F.R., 1979. Microscopy of the Pericarp and the Testa of Different Genotypes of Sorghum 1. *Crop Sci.* 19, 837–842. <https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183x001900060023x>

Boren, B., Waniska, R.D., 1992. Sorghum seed color as an indicator of tannin content. *J. Appl. Poult. Res.* <https://doi.org/10.1093/japr/1.1.117>

Brambillasca, S., Fernández-García, M., Aguerre, M., Repetto, J.L., Cajarville, C., 2019. Characterization of the *in vitro* digestion of starch and fermentation kinetics of dry sorghum grains soaked or rehydrated and ensiled to be used in pig nutrition. *J. Cereal Sci.* 89, 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102817>

Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., Backhouse, D., 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research, 3rd ed. Department of Crop Science, University of Sydney, Sydney.

Carrasco, N., Zamora, M., Melin, A., 2011. Manual del sorgo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 112p.

https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_manual_de_sorgo_renglon_191.pdf

Cerling, T.E., Harris, J.M., MacFadden, B.J., Leakey, M.G., Quadek, J., Eisenmann, V., James R. Ehleringer, J.R., 1997. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. *Nature* 389:153-158.

<https://userweb.weihenstephan.de/lattanzi/Lit/Cerling%20et%20al%201997.pdf>

- Chalkling, D., 2016. Ensilaje de Grano Húmedo. Disponible en: http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/actividades/silos/g_humedos_08.pdf.
- Chalkling, D., Brasesco, R., 1997. Ensilaje de grano húmedo: una alternativa promisoría. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9364/1/Ensilaje-de-grano-humedo.1997.Chalkling-Brasesco.pdf>
- Cheli, F., Campagnoli, A., Dell'Orto, V., 2013. Fungal populations and mycotoxins in silages: from occurrence to analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 183:1-16. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.01.013>
- Chiossone, J., Misi, O., Vicini, R., 2011. Silaje de sorgo. INTA. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/silaje-de-sorgo/>
- Cotty, P.J., 1994. Comparison of four media for the isolation of *Aspergillus flavus* group fungi. *Mycopathologia.* 125:157-62. <https://doi:10.1007/BF01146521>
- Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. CAST, Ames. Disponible en: <https://www.international-foodfety.com/pdf/Mycotoxins%20%20Risks%20in%20Plant,%20Animals%20and%20Human%20Systems.pdf>
- Cruz-Hernández, M., Contreras-Esquivel, J.C., Lara, F., Rodríguez, R., Aguilar, C.N., 2005. Isolation and Evaluation of Tannin-degrading Fungal Strains from the Mexican Desert. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 60:844-848. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-11-1205>
- Cummins, D.G. 1971. Relationship between tannin content and forage digestibility in sorghum. *Agron. J.* 63:500-502. <https://doi.org/10.2134/agronj1971.00021962006300030046x>
- Curbelo, A.R., 2010. Ensilaje de grano de sorgo con diferente contenido en taninos: efecto sobre la composición química, degradabilidad ruminal, digestibilidad intestinal y fermentación ruminal. Tesis Magister en Ciencias Agrarias, Orientación Ciencia Animal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Uruguay. 99 p.
- Da Silva, J.B., Dilkin, P., Fonseca, H., Correa, B., 2004. Production of aflatoxin by *Aspergillus flavus* and fumonisin by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. *Braz. J. Microbiol.* 35:182-186. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000200002>
- De Bernardi, L.A. 2019. Perfil del sorgo. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Presidencia de la Nación, Buenos Aires. Disponible en: https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/informes/perfil-de-sorgo-2019.pdf

Degener, J.F., 2015. Atmospheric CO₂ fertilization effects on biomass yields of 10 crops in northern Germany. *Front. Environ. Sci.*, 3:1-14.

<https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00048>

DIEA. 2019. Anuario estadístico agropecuario. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. DIEA, Montevideo. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-diea-2019>

D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M., MacDonald, A.M.C., 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 80:183-205. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00059-0)

Ellis, M., 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. C.A.B. International Mycological Institute Kew, Surrey, England.

European Commission, 2002. Directive 2002/32/EC on undesirable substances in animal feed. *Off. J. Eur. Union*. Disponible en: <https://eur-x.europa.eu/eli/dir/2002/32/oj>

FAO, 2004. Reglamentos a nivel mundial para las Micotoxinas en los alimentos y las raciones en el año 2003. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 81. Cuadernos técnicos de la FAO. <http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s00.html>

FAOSTAT FAO Statistics Division 2020 Retrieved June 30, 2020, from <http://faostat.fao.org/> 2020

Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, S.B., Nováková, A., Chen, A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., Houbraken, J., 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud. Mycol.* 93 :1-63.

<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>

Gallo, A., Giuberti, G., Frisvad, J.C., Bertuzzi, T., Nielsen, K.F., 2015. Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins (Basel)*. 7:3057-3111.

<https://dx.doi.org/10.3390%2Ftoxins7083057>

García y Santos, C., Bettucci, L., Brambillasca, S., Cajarville, C., 2020. Storage time and condensed tannin content of high-moisture sorghum grains: Effects on in vitro fermentation and mold populations. *Anim. Nutr.* 6:92-97.

<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.08.002>

Gemeda, B.S., Hassen, A., 2015. Effect of Tannin and Species Variation on in vitro Digestibility, Gas, and Methane Production of Tropical Browse Plants. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 28:188-199. <https://dx.doi.org/10.5713%2Fajas.14.0325>

- Gollcher, A.M.R., Lima, J.A.F., Fialho, E.T., Rodrigues, P.B., Lima, R.R., 2010. Comparison between two methods for estimating the digestibility of starch and other nutrients in high moisture sorghum grain silage in horses. R. Bras. Zootec. 39:1258. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010000600013>
- Gomes de Araújo, P.R., Ramalho, T.C., Newton de Lucena, C., Avelar, M.J., 2008. Processos de ensilagem e plantas a ensilar. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Porto Velho, Rondônia. 18 p.
- González, H.H.L., Martínez, E.J., Resnik, S.L., 1997. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. Mycopathologia.139:35-41. <https://doi.org/10.1023/A:1006803901969>
- González-Pereyra, M., Chiacchiera, S., Rosa, C., Sager, R., Dalcerro, A., Cavaglieri, L., 2011. Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. J. Sci. Food Agric. 91:1474-1481. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4336>
- Graminha, E.B.N., Gonçalves, A.Z.L., Pirola, R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A., da Silva, R., Gomes, E., 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. Anim. Feed Sci. Technol. 144:1-22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029>
- Hadebe, S.T., Modi, A.T., Mabhaudhi, T., 2017. Drought Tolerance and Water Use of Cereal Crops: A Focus on Sorghum as a Food Security Crop in Sub-Saharan Africa. J. Agron. Crop Sci. 203:177-191. <https://doi.org/10.1111/jac.12191>
- Harris, H., Burns, R., 1973. Relationship between tannin content of sorghum grain and preharvest seed molding. Agron. J. 65:957-959. <https://doi.org/10.2134/agronj1973.00021962006500060033x>
- Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E., Cole, J.R., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Invest. 2:217-221. <https://doi.org/10.1177%2F104063879000200312>
- Hibberd, C.A., Wagner, D.G., Schemm, R.L., Mitchell, Jr.E.D., Hintz, R.L., Weibel, D.E., 1982. Nutritive characteristics of different varieties of sorghum and corn grains. J. Anim. Sci. 55:665-672. <https://doi.org/10.2527/jas1982.553665x>
- Hibberd, C.A., Wagner, D.G., Hintz, R.L., Griffin, D.D., 1985. Effect of sorghum grain variety and reconstitution on site and extent of starch and protein digestion in steers. J. Anim. Sci. 61:702-712. <https://doi.org/10.2527/jas1985.613702x>

Honig, H., Woolford, M.K., 1980. Changes in silage on exposure to air. In: C. Thomas (ed.) Forage Conservation in the 80s. Occasional Symposium No. 11. British Grassland Society, Hurley, Berkshire, UK. p. 76-87.

Huck, G.L., Kreikemeier, K.K., Bolsen, K.K., 1999. Effect of reconstituting field-dried and early-harvested sorghum grain on the ensiling characteristics of the grain and on growth performance and carcass merit of feedlot heifers. *J. Anim. Sci.* 77:1074-1081. <https://doi.org/10.2527/1999.7751074x>

Huntington, G.B., 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75:852-867. <https://doi.org/10.2527/1997.753852x>

IARC, 1993. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins. IARC Press, Lyon, Francia. pp. 245-297.

IARC, 2002. Aflatoxins. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. World Health Organization, 82:171-249.

Jambunatham, R., Kherdekar, M., Stenhouse, J. 1992. Sorghum grain hardness and its relationship to mold susceptibility and mold resistance. *J. Agric. Food Chem.* 43:215-218. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00020a023>

Klaasen, J.A., Nelson, P.E., 1998. Identity of *Fusarium nygamai* isolates with long and short microconidial chains from millet, sorghum and soil in Africa. *Mycopathologia.* 140:171-176. <https://doi.org/10.1023/A:1006863825469>

Keller, L., González-Pereyra, C., Keller, K., Alonso, V., Oliveira, A., Almeida, T., Barbosa, T., Nunes, L., Cavaglieri, L., Rosa, C., 2013. Fungal and mycotoxins contamination in corn silages: monitoring risk before and after fermentation. *J. Stored Prod. Res.* 52:42-47. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.09.001>

Keller, L.A.M., González Pereyra, M.L., Keller, K.M., Alonso, V.A., Oliveira, A.A., Almeida, T.X., Barbosa, T.S., Nunes, L.M.T., Cavaglieri, L.R., Rosa, C.A.R., 2012. Fungi and aflatoxin B1 in pre and post fermented sorghum trench type silos destined to bovine intensive-rearing in Brazil. *Rev. Biocien.* 2:81-91. <https://doi.org/10.15741/revbio.02.01.08>

Kimber, C.T., 2000. Origins of Domesticated Sorghum and its Early Diffusion to India and China. Pages 3-98 in C. W. Smith and R. A. Frederiksen, eds., *Sorghum: Origin, History, Technology, and Production*. John Wiley & Sons Inc, New York. <http://www.ask-force.org/web/Africa-Harvest-Sorghum-Lit-1/Kimber-Origins-Sorghum-2000.PDF>

Klich, M.A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, the Netherlands: CBS.

Klich, M., Pitt, J., 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 91:99-108.

Knický, M., 2005. Possibilities to improve silage conservation. Effects of Crop, Ensilaging Technology and Additives. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, p. 34

Kumar, R., Vaithyanathan, S., 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Anim. Feed Sci. Tech.* 30:21-38. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(90\)90049-E](https://doi.org/10.1016/0377-8401(90)90049-E)

Kumar, R., Singh, M., 1984. Tannins: their role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 32:447-453. <https://doi.org/10.1021/jf00123a006>

Lahouar, A., Jedidi, J., Sanchis, V., Saïd, S., 2018. Aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in sorghum grains marketed in Tunisia. *Food. Addit. Contam. B.* 11:103-110. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1433239>

Lanzas, C., Fox, D.G., Pell, A.N., 2007. Digestion kinetics of dried cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136: 265-280. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.09.004>

Leslie, J.F. 2014. Mycotoxins in the Sorghum Grain Chain, p. 282-296. In: J.F. Leslie, and A.F. Logrieco (Eds.), *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. 5th ed. John Wiley & Sons, Ames. <https://doi.org/10.1002/9781118832790.ch20>

Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA.

Lopes, A.B.R.C., Tse, M.L.P., Silva, A.M.R., Trindade Neto, M.A., Pereira, S.C., Saleh, M.A.D., Berto, D.A., 2017. High-moisture sorghum grain silage with low- and high-tannin contents for weanling piglets. *Ciênc. Rural.* <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255>

López, S., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., France, J., 2007. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135: 139-156. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.005>

Machio, A., 2016. Mycoflora Compositions of Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Grains from Eastern Region of Kenya. *J. Agric. Environ. Int. Dev.* 8:1-13. <https://doi.org/10.9734/JAERI/2016/26316>

Magalhaes, P.C., Alvarenga, W., Rodrigues, F.O., Duraes, M., 1997. Tanino no grão de sorgo bases fisiológicas e métodos de determinação. Circular Técnica Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. 26 p.

Magan, N., D. Aldred, and E.S. Baxter. 2014. Good Post-Harvest Storage Practices for Wheat Grain. Ch. 18. p. 258-267. In: J.F. Leslie, and A.F. Logrieco (Eds.), *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. 5th ed. John Wiley & Sons, Ames. <http://doi.org/10.1002/9781118832790.ch18>

Magan, I., Aldred, D., 2008. Environmental fluxes and fungal interactions: Maintaining a competitive edge, p. 19-35. In P. van West, S. Avery, and M. Stratford (Eds.), *Stress in Yeast and Filamentous Fungi*. Elsevier, Amsterdam. [https://doi.org/10.1016/S0275-0287\(08\)80044-6](https://doi.org/10.1016/S0275-0287(08)80044-6)

Magan, N., Aldred, D., Baxter, E.S., 2014. Good Post-Harvest Storage Practices for Wheat Grain. Ch. 18. p. 258-267. In: J.F. Leslie, and A.F. Logrieco (Eds.), *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. 5th ed. John Wiley & Sons, Ames. <http://doi.org/10.1002/9781118832790.ch18>

Makkar, H.P.S. 2000. Quantification of Tannins in Tree Foliage. FAO/IAEA, Vienna. Disponible en: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/pubd31022manual-tannin.pdf>

Mannaa, M., Kim, K.D., 2017. Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Microbiology*. 45:240-254. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.240>

Mansfield, M.A., Archibald, D.D., Jones, A.D., Kuldau, G.A., 2007. Relationship of spinganine analog mycotoxin contamination in maize silage to seasonal weather conditions and to agronomic and ensiling practices. *Phytopathology*. 97:504-511. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-97-4-0504>

Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C., Coetzer, J.A., Thiel, P.G., Van der Lugt, J.J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 55:97-203. <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/42389/43marasas1988.pdf?sequ>

Mauricio, R.M., Pereira, L.G.R., Gonçalves, L.C., Rodriguez, N.M., Martins, R.G.R., Rodriguez, J.A.S., 2003. Potencial da técnica in vitro semiautomática de produção de gases para avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Rev. Bras. Zootec.* 32:1013-1020. <https://www.scielo.br/j/rbz/a/mJkKymrWFpNkjB8LGzfQqmg/?lang=pt>

Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K., 1999. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79:321-330. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4)

Mc Mullen, M.P., Stack, R.W., 1983. *Fusarium* species associated with grassland soils. *Can. J. Bot.* 61:2530-2538. <https://doi.org/10.1139/b83-277>

Menkir, A., Ejeta, G., Butler, L., Melakeberhan, A., 1996. Physical and chemical kernel properties associated with resistance to grain mold in sorghum. *Cereal Chem.* 73:613-617.

https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1996/Documents/73_613.pdf

MERCOSUR. 2002. Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz. GMC/RES. N° 25/02. Available at: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/155-2006>. Accessed 15 October 2020.

Mertens, D.R., Allen, M., Carmany, J., Clegg, J., Davidowicz, A., Drouches, M., Frank, K., Gambin, D., Garkie, M., Gildemeister, B., Jeffress, D., Jeon, C.S., Jones, D., Kaplan, D., Kim, G.N., Kobata, S., Main, D., Moua, X., Paul, B., Robertson, J., Taysom, D., Thiex, N., Williams, J., Wolf, M., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *J. AOAC Int.* <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>

Methol, M., 2016. Maíz y sorgo: situación y perspectivas. En: Anuario OPYPA. https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/Anuario%202016/anuario_opypa_2016_en_baja.pdf

Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1984. Kinetics of tannin deactivation during anaerobic storage and boiling treatment of high tannin sorghum. *J. Food Sci.* 49:1566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12845.x>

Mitzner, K.C., Owens, F.G., Grant, R.J., 1994. Comparison of sorghum and corn grains in early and midlactation diets for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:1044-1051. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77040-5).

Mok, C., Shin, S.Y., Kim, B.G., 2013. Aflatoxin, deoxynivalenol, and zearalenone in swine diets: Predictions on growth performance. *Rev. Colomb. de Cienc. Pecu.*, 23:243-254.

https://www.researchgate.net/publication/269409356_Aflatoxin_deoxynivalenol_and_zearalenone_in_swine_diets_Predictions_on_growth_performance

Montani, M.L., Vaamonde, G., Resnik, S.L., Buera, P., 1988. Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. *Int. J. Food. Microbiol.* 6:349-353. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90029-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90029-3)

Moss, M.O., 1996. Mycotoxins. *Mycol. Res.* 100:513-523. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80001-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80001-3)

Mould, F.L., Morgan, R., Kliem, K.E., Krystallidou, E., 2005. A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:155-172. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.002>

- Murugan, K., Al-Sohaibani, A., 2010. Biocompatible tannin and associated color from tannery effluent using the biomass and tannin acyl hydrolase enzymes of mango industry solid waste isolate *Aspergillus candidus* MTCC 9628. Res. J. Microbiology. 5:262-271. <https://doi.org/10.3923/jm.2010.262.271>
- Nelson, P.E., Tousson, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification. University Park, Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, Abington.
- O'Brien, M., Egan, D., O'Kiely, P., Forristal, P.D., Doohan, F.M., Fuller, H.T., 2008. Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. Mycol. Res. 112:921-932. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.023>
- Offner, A. Bach, A., Sauvart, D., 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. Anim. Feed Sci. Technol. 106:81-96. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00038-5)
- Ogunade, I., Arriola, K., Jiang, Y., Driver, J., Staples, C., Adesogan, A., 2016. Effects of 3 sequestering agents on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune status of dairy cows fed diets artificially contaminated with aflatoxin B1. J. Dairy Sci. 99:6263-6273. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10905>
- Ojeda, F., Caceres, O., Esperance, M., 1990. Nutrición de rumiantes: Guía metodológica de investigación. San José. RISPAL-IICA.
- Osman, M.A., Salama, A.K., Naguib, H.M., Abdel-Wahhab, M.A., Sherif, S.R. 2017. Fungi and mycotoxins associated with egyptian sorghum. MOJ Toxicol. 3:51-56. <http://medcraveonline.com/MOJT/MOJT-03-00052.pdf>
- Owens F.N., Zinn R. A. 2005. Corn Grain for Cattle: Influence of Processing on Site and Extent of Digestion. Proc. Southwest Nutr. Conf.: 86-112. <http://beefextension.okstate.edu/files/Proceedings%20final.pdf>
- Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J., Gill DR. 1997. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. J. Anim. Sci. 75:868. <https://doi.org/10.2527/1997.753868x>
- Patrício., V.M.I., Furlan, A.C., Moreira, I, Martins, E.N., Jobim, C.C., Costa, C., 2006. Avaliação nutricional da silagem de grãosúmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo de taninos para leitõesna fase de creche. R. Bras. Zootec. 35:1406-1415. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982006000500021>
- Pereyra, C., L. Cavaglieri, S. Chiacchiera, Dalcero, A., 2010. Fungi and Mycotoxins in feed intended for sows at different reproductive stages in Argentina. Vet. Med. Int. 10:1-7. <https://doi.org/10.4061/2010/569108>

- Pitt, J., Hocking, A., 2009. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London. Springer. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Pitt, J.I., Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Harwood Academic Publishers, Amsterdam. p. 9-79.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Glenn, D.R., 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. J. Appl. Bacteriol. 54:109-14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01307.x>
- Pitt, J.I., 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Tamaracks*. London: Academic Press.
- R Core Team., 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reed, J.D., 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. J. Anim. Sci. 73:1516-1528. <https://doi.org/10.2527/1995.7351516x>
- Reichert, R.D., Fleming, S.E., Schwab, D.J., 1980. Tannin deactivation in nutritional improvement of sorghum by anaerobic storage of water-, hydrochloric acid-, or sodium hydroxide- treated grain. J. Agric. Food Chem. 28 (4): 824-829. <https://doi.org/10.1021/jf60230a045>
- Ribeiro-Pereira, L.G., Rodriguez, N.M., Gonçalves, L.C., 2007. Consideraciones sobre ensilajes de sorgo. Jornadas sobre Producción y Utilización de Ensilajes. http://www.cpatasa.embrapa.br/public_electronica/downloads/OPB1703.pdf
- Richard, E., Heutte, N., Bouchart, V., Garon, D., 2009. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. Anim. Feed Sci. Technol. 148:309-320. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.02.004>
- Rooney, L.W., Pflugfelder, R.L., 1986. Factors Affecting Starch Digestibility with Special Emphasis on Sorghum and Corn. J. Anim. Sci. 63:1607-1623. <https://doi.org/10.2527/jas1986.6351607x>
- Rovira, P., Velazco, J., 2012. Ensilaje de Grano Húmedo de Sorgo: Guía Práctica para su uso en la alimentación de ganado en regiones ganaderas. Boletín de Divulgación N° 101, INIA, Montevideo, Uruguay. <inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429110612095450.pdf>
- Rowe, J.B., Choct, M., Pethick, D.W., 1999. Processing cereal grains for animal feeding. Aust. J. Agric. Res. 50:721-736. <http://www.publish.csiro.au/nid/40/paper/AR98163.htm>

Samson, A., Hoekstra, E., Frisvad, J., Filtenborg, O., 1995. Mycological media for food-borne fungi. Introduction to Food-Borne Fungi. Fourth Edition (eds. Samson, A., Hoekstra, E., Frisvad, J. & Filtenborg, O.) Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands. pp.308.

SAS Inc. SAS® User's Guide: Statistics, Version 9.0 SAS 2002. Institute Inc, Cary, NC, USA.

Schmidt, P., Novins, K.I.C.O., Junges, D., Almeida, R., de Souza, C.M., 2015. Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: A farm survey using infrared thermography. *J. Dairy Sci.*, 98:6609-6619. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8617>

Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: A review. *Anim. Feed Sci Technol.*91: 21-40.
[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)

Scudamore, K.A., Livesey, T., 1998. Occurrence and significance of micotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric.* 77:1-17.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199805\)77:1<1::AID-JSFA9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<1::AID-JSFA9>3.0.CO;2-4)

Scussel, V.M., 1998. Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas. En: *Micotoxinas em Alimentos* (ed. Rolim de Moura, N.). Editora Insular Ltda., Florianópolis, Brasil.

Serna-Saldivar, S.O., Espinosa-Ramírez, J., 2019. Grain Structure and Grain Chemical Composition, en: *Sorghum and Millets*. Elsevier, pp. 85–129.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00005-8>

Sinha, S.K. 1993. Response of Tropical Agroecosystems to Climate Change, p. 281-289. In D.R. Buxton, R. Shibles, R.A. Forsberg, B.L. Blad, K.H. Asay, G.M. Paulsen, and R.F. Wilson (Eds.), *International Crop Science*. Crop Science Society of America, Madison.

Snyder, A.B., Churey, J. J., Worobo, R.W., 2019. Association of fungal genera from spoiled processed foods with physicochemical food properties and processing conditions *Food Microbiology*. 83: 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.012>

Sreenivasa, M.Y., Dass, R., Janardhana, G.R., 2010. Survey of postharvest fungi associated with sorghum grains produced in Kkarnataka (India). *J. Plant. Prot. Res.* 50:335-339. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0057-6>

Stoloff, L. 1980. Aflatoxin M in Perspective. *J. Food Prot.* 43:226-230.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.3.226>

- Storm M.L.D., Rasmussen, R.R., Rasmussen, P.H., 2014. Occurrence of pre- and post-harvest mycotoxins and other secondary metabolites in Danish maize silage. *Toxins* (Basel). 6:2256-2269. <https://dx.doi.org/10.3390%2Ftoxins6082256>
- Streeter M.N., Wagner D.G., Hibbered C.A., Owens F.N., 1990. Comparison of corn with four sorghum grain hybrids: site and extent of digestion in steers. *J. Anim. Sci.* 68: 3429-3440. <https://doi.org/10.2527/1990.68103429x>
- Sulzberger, S.A., Melnichenko, S., Cardoso, F.C., 2017. Effects of clay after an aflatoxin challenge on aflatoxin clearance, milk production, and metabolism of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 100:1856-1869. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11612>
- Sweeney, M., Dobson, A., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International J. Food Microbiol.* 43:141-158. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00112-3)
- Taylor, J.R.N., 2018. Sorghum and millets: Taxonomy, history, distribution, and production, *Sorghum and Millets: Chemistry, Technology, and Nutritional Attributes*. AACCI. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00001-0>
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mc Allan, A.B., France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Thrane, U. 1996. Comparison of three selective media for detecting *Fusarium* species in foods: a collaborative study. *Int. J. Food Microbiol.* 29:149-156. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00040-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00040-2)
- Tortorolo, M., Curbelo, A., Cajarville, C., Repetto, J.L., Aguerre, M., 2012. Silage process affects chemical composition and digestion site in high moisture sorghum grain. *J. Anim. Sci.* 90: 201.
- Trucksess, M.W., Thomas, F.S., Page, S.W., 1994. High-performance liquid chromatographic determination of 1,1'-ethylidenebis (L-tryptophan) in L-tryptophan preparations. *J. Pharm. Sci.* 83:720-722. <https://doi.org/10.1002/jps.2600830525>
- Tunistra, M.R., 2008. Food-grade sorghum varieties and production considerations: A review. *J. Plant Interact.* 3:69-72. <https://doi.org/10.1080/17429140701722770>
- Urrego, J.R., Diaz, G.J., 2006. Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v54n2/v54n2a06.pdf>
- Van Barneveld, S.L., 1999. Chemical and physical characteristics of grains related to variability in energy and amino acid availability in ruminants: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 651-666. <https://sci-hub.se/10.1071/AR98159>

Van Soest, P.J., 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Ed. Cornell University Press. 2^o ed. New York.

<https://www.bibliotecaagptea.org.br/zootecnia/nutricao/livros/NUTRICA0%20DE%20RUMINANTES.pdf>

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)

Veldman, J.A.C., Meijs, A., Borggreve, G.J., Heeres-van der Tol, J.J., 1992. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. Anim. Prod. 55:163-168.

<https://doi.org/10.1017/S0003356100037417>

Visagie, C.M., Houbraken, J., J.C., Frisvad, S., Hong, B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Studies in Mycology 78: 343-371.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.

Visarada, K.B.R.S., Aruna, C., 2019. Sorghum: A Bundle of Opportunities in the 21st Century. In: Breeding Sorghum for Diverse End Uses. Aruna, C. Visarada, K.B.R.S., Bhat, B.V., Tonapi, V.A. (Eds). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101879-8.00001-2>

Waniska, R.D., 2000. Structure phenolic compounds and antifungal proteins of sorghum caryopses. Technical and Institutional Options for Sorghum Grain Mold Management: Proceeding of an international Consultation, 18-19 May 2000, ICRISAT, Patancheru, India, 2000.

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.602.8474&rep=rep1&type=pdf>

Weledesemayat, G.T., Gezmu, T.B., Woldegiorgis, A.Z., Gemed, H.F., 2016. Study on *Aspergillus* Species and Aflatoxin Levels in Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) stored for different period and storage system in Kewet Districts, Northern Shewa, Ethiopia. J. Food Sci. Nutr. 2:1-8. <http://dx.doi.org/10.24966/FSN-1076/100010>

Whitlow, L.W., Hagler, W.M., 2005. Mycotoxins in dairy cattle: Occurrence, toxicity, prevention and treatment. Proc. Southwest Nutr. Conf. 124-138. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/publication/237664280>.

Woolford, M.K., 1975. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (c1-c12) as potential silage additives. J. Sci. Food Agric. 26:219-228.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740260213>

Yiannikouris, A., Jouany, J.P., 2002. Review article Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. J. Appl. Anim. Res. 51:81-99. <https://doi.org/10.1051/animres>

Zain, M., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. J. Saudi Chem. Soc. 15:129-144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. Food Chem. Toxicol. 45:1-18. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>

10. ANEXOS

10.1. Artículo 1.

García y Santos, C., Bettucci, L., Brambillasca, S., Cajarville, C., 2020. Storage time and condensed tannin content of high-moisture sorghum grains: Effects on *in vitro* fermentation and mold populations. Anim. Nutr. 6:92-97.

10.2. Artículo 2.

García y Santos, C., Cajarville, C., Suárez, G., Bettucci, L., 2022. How do Time, Tannin and Moisture Content Influence on Toxicogenic Fungal Populations during the Storage of Sorghum Grains? Journal of Food Protection JFP-21-239.

10.3. Artículo 3.

García y Santos, C., Bettucci, L., Cajarville, C., Does a longer storage time improve *in vitro* rumen fermentation of high moisture - high tannin sorghum grain?



Short Communication

Storage time and condensed tannin content of high-moisture sorghum grains: Effects on in vitro fermentation and mold populations

Carmen García y Santos^{a,*}, Lina Bettucci^b, Sebastián Brambillasca^c, Cecilia Cajarville^c^a Laboratorio de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, PC 11.600, Montevideo, Uruguay^b Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Julio Herrera y Reissig 565, PC 11.300, Montevideo, Uruguay^c Instituto de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1, km 42.200, PC 80.100, San José, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2019

Received in revised form

2 August 2019

Accepted 20 August 2019

Available online 17 September 2019

Keywords:

Sorghum grains silages

Condensed tannins

Toxicogenic fungal populations

Storage time

ABSTRACT

Silage of high moisture sorghum grains is a highly relevant source of energy in cattle production systems in South America. There is little information related to the chemical characteristics, the kinetics of fermentation and the toxic fungal populations of these feedstuffs. The aim of this study was to evaluate the effect of storage time and condensed tannins content of the grain on chemical composition, in vitro fermentation parameters, and toxicogenic fungal populations of moist sorghum grain stored in silo-bags. Samples of 2 varieties of sorghum grains (high-tannin [HT] and low-tannin [LT]), were obtained during the grain harvest before silage making and after 30, 90, and 180 d of storage ($n = 16$). High-tannin grains had higher acid detergent fiber, tannins, gas production ($P < 0.05$) and lower starch and rate of gas production ($P < 0.01$). Interaction variety \times storage time were observed for all chemical parameters ($P < 0.01$), except for neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash (aNDF) and pH. Starch and protein content increased in both varieties, tannins decreased in HT and LT, and organic matter (OM) increased in HT and declined in LT ($P < 0.05$). The rate of gas production increased with the storage time for HT and LT ($P < 0.01$). A linear reduction in the *Aspergillus* number of colonies in the HT varieties was observed ($P < 0.01$), whereas a linear increase in *Penicillium* isolation was detected in the LT sorghums ($P < 0.01$). The storage time was beneficial in terms of decreasing the condensed tannins, increasing fractional rate of gas production and minimizing fungal contamination, particularly on HT grains.

© 2019, Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co., Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

The nutritional value of sorghum grain is considered lower than that of other cereal grains owing to different factors inherent to the grain (Offner et al., 2003). The concentration of phenolic compounds (tannins) in some genotypes, the nature of endosperm proteins (kafirins), and the association of these proteins with the

starch, would be responsible for the lower nutritive value of sorghum grain (Huntington, 1997; Schofield et al., 2001; Offner et al., 2003). Nevertheless, sorghum has some advantages over other grains, such as resistance to climatic difficulties, insect attack, and fungal contamination (Waniska, 2000). This resistance to mold contamination is strongly associated with high concentrations of phenolic compounds (i.e. tannins, flavan-4-ols) and kernel hardness (Menkir et al., 1996; Waniska, 2000). To minimize negative consequences of these compounds on nutritive value, measured in vitro or in vivo, sorghum grains can be subjected to different processing methods. Rolling and grinding (Owens et al., 1997), soaking, germination and reconstitution of dry grains with water (Balogun et al., 2005). Moreover, anaerobic fermentation with a moisture content of at least 25% (Lopes et al., 2017) has been used, along with other techniques. In fact, a previous study from our group (Aguerre et al., 2015) showed that a combination of germination and ensiling sorghum grains reduced the tannin content and

* Corresponding author.

E-mail address: cgarciaysantos@gmail.com (C. García y Santos).

Peer review under responsibility of Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine.



increased the ruminal degradability and total digestibility of the grains. Given these results, it is expected that the ensiling of early-harvested sorghum would improve the nutritive value of the grain.

Otherwise, during the silage process, grains can be contaminated with toxicogenic fungi, which is related to the level of humidity and temperature of the silages (González-Pereyra et al., 2011). Most of the toxicogenic fungi generally isolated from grain silages correspond to the *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* genera (Alonso et al., 2013; Cheli et al., 2013). These fungi produce secondary metabolites (mycotoxins) that cause mycotoxicosis in livestock, domestic animals and humans, and their consumption is a significant public health risk (Richard, 2007). The production of mycotoxins is favored by environmental factors (weather conditions, agricultural methods, etc.) and the susceptibility of some grain genotypes to fungal contamination during processing and storage periods (Jonathan and Esho, 2010). Given the relevance of this type of food in our production systems and the scarce information related to chemical characteristics, fermentation kinetics, and toxicogenic fungal populations in moist sorghum grain silages, we proposed to carry out a study to investigate all these aspects.

Therefore, the main goal of this work was to evaluate the effect of grain variety and storage time on chemical composition, in vitro fermentation parameters, and populations of total fungi and of toxicogenic genera in sorghum grain silages.

2. Materials and methods

This study was conducted following the guidelines recommended by the Bioethics Committee of Animal Experimentation of the Veterinary Faculty, University of the Republic, Montevideo, Uruguay.

2.1. Sample collection

Samples of high-moisture sorghum grain silages were collected from commercial dairy farms located in San José and Flores Departments (33°33'28.3" S 56°52'37.7" W and 34°31'07.5" S 56°32'21.1" W), in the south-central area of Uruguay. The silos were representative of the size and storage method mostly used in dairy farms in the region and selected according to the variety of sorghum grain used for preparing the silages. In this way, silage samples were obtained from 4 farms: 2 made with sorghum varieties high in tannins (HT, genotypes Morgan 108 and ACA 558) and 2 made with varieties with low tannin content (LT, genotypes Flash 10 and ACA 546). The sample from each genotype was considered replicate for the variety (HT or LT). For high-moisture grain silage, grains were harvested at approximately 30% moisture content, mechanically chopped, and enclosed within polystyrene bags of 250 µm thickness. The silo bags were 60 m in length, 1.7 m in height, and 2.5 m in diameter, and were each filled with about 180 t of grain. Grain samples were collected during the ensiling process (d 0), and the silos were sampled on d 30, 90, and 180 after storage. Sorghum grains subsamples were manually taken with a cutting machine at 6 equidistant points along silos at 50-cm horizontal depth in transects at 3 levels (upper, middle, and lower). Grains subsamples were mixed and homogenized to obtain 1 kg of sample from all points and stored at -20 °C until analysis.

2.2. Chemical analysis

The dry matter (DM), ashes, and crude protein (CP) contents of sorghum samples were determined according to AOAC official methods as described by procedures 934.01, 923.93, and 984.13, respectively (Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1997). Organic matter (OM) content was calculated as the

difference between DM and ashes. The neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash (aNDF) analysis was based on the procedures described by Mertens (2002), using heat-stable α -amylase and expressed inclusive of residual ash. Acid detergent fiber (ADF) levels were determined according to Van Soest et al. (1991) in an ANKOM 220 fiber analyzer (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA). Total starch content was determined using a total starch assay kit (K-TSTA 06/17, Megazyme Int., Wicklow, Ireland). Condensed tannins (CT) were analyzed with the butanol-HCl method described by Makkar (2000). The pH was measured on-site immediately after obtaining the samples using a digital pH meter (EW-05991-36, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, USA) and diluting 10 g of grain with 100 mL of distilled water. Chemical composition, in vitro fermentation parameters, and total and toxicogenic fungal population of sorghum grains before the ensiling process are summarized in Table 1.

2.3. In vitro gas production

To evaluate the ruminal fermentation of sorghum grains before and after the ensiling process, fermentation kinetics of the grains were assessed using a cumulative in vitro gas production technique, according to Mauricio et al. (1999). Samples were weighed (0.5 g DM) and placed in 100 mL bottles. Then, 18 mL of a buffer solution containing Na₂HPO₄·12H₂O, KH₂PO₄ and MgCl₂·6H₂O, 18 mL of a buffer solution composed of NaHCO₃ and NH₄HCO₃ and 4 mL of a reducing solution containing NaOH and cysteine HCl, were added to each fermentation bottle under continuous CO₂ stream as described by Mould et al. (2005). Afterward, bottles were sealed with butyl rubber stoppers and stored at 4 °C for 12 h to hydrate substrates. Prior to inoculation, bottles were pre-warmed in a water bath at 39 °C for 2 h. Then, each bottle was inoculated with 10 mL of a mixture of single fluids taken from 2 ruminally cannulated Holstein cows, fed a diet composed by oats hay *ad libitum*, 3.3 kg of sorghum grain, 1.7 kg of soybean meal, 50 g of urea

Table 1
Chemical composition, in vitro fermentation parameters, and fungal populations of sorghum grains before ensiling.

Item	Genotypes ¹			
	1	2	3	4
DM, g/kg	763.7	696.3	727.5	845.1
Chemical composition, g/kg DM				
OM	975.2	978.9	980.7	981.6
aNDF	278.6	201.6	151.5	172.9
ADF	86.0	112.1	37.8	71.9
Starch	587.2	695.2	701.6	684.5
CP	83.5	73.3	76.0	99.8
CT	12.3	7.8	0.9	0.7
pH	4.89	5.95	4.53	6.53
Fermentation parameters ²				
a, mL of gas/g OM	331.2	317.4	299.5	296.6
kd, per h	0.074	0.058	0.052	0.057
L, h	2.62	2.93	2.91	3.01
Fungal population (number of isolates)				
Total molds	22	90	10	171
<i>Fusarium</i>	0	6	0	25
<i>Aspergillus</i>	15	56	1	1
<i>Penicillium</i>	2	23	3	4

DM = dry matter; OM = organic matter; aNDF = neutral detergent fiber assayed with heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash; ADF = acid detergent fiber expressed inclusive of residual ash; CP = crude protein; CT = condensed tannins.

¹ Genotypes 1, 2, 3, and 4 are samples of the genotypes Morgan 108, ACA 558, Flash 10, and ACA 546, respectively.

² a, potential gas production; kd, fractional rate of gas production; L, gas production lag time.

and 30 g of a mineral premix. Immediately after inoculation, flasks were gassed again with a CO₂ stream; butyl stoppers were fastened with aluminum crimp seals and remained in the water bath throughout the measurement period. Three bottles per genotype and storage time were incubated (48 bottles containing substrate, plus 3 with no substrate included as inoculum blanks; in total: 51 bottles), and the whole procedure was conducted in 2 runs. All the bottles incubated per variety and storage time were considered analytical repetitions.

Gas production was measured in the bottles at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72, and 96 h after inoculation using a transducer fixed to a pressure meter (840065, Sper Scientific, Scottsdale, AZ, USA) and registered in psi units. Gas volume in milliliters was predicted from psi values using an equation obtained in a previous trial conducted under the same experimental conditions. The data for cumulative gas production was fitted to the model:

$$V = a \times [1 - e^{-kd \times (t - L)}],$$

where V is the cumulative gas production at time t (mL/g DM incubated), a is the potential gas production (mL/g DM incubated), kd is the fractional rate of gas production (per h) and L is the gas production lag time (h).

2.4. Mycological analysis

For fungi isolation, 100 grains of sorghum from each sample were randomly selected, and surface sterilized in a 0.4% solution of NaOCl for 1 min, rinsed 3 times with sterile distilled water, and dried with sterile absorbent paper. Seeds were subsequently placed in Petri dishes containing potato dextrose agar (Sigma–Aldrich, 70139). Plates were incubated at 25 °C and alternating cycles of light and dark for 7 to 10 d. At the end of this period, the resulting colonies were transferred to fresh media to allow identification, following conventional mycological methods as previously described (Nelson et al., 1983; Klich, 2002; Leslie and Summerell, 2006). Black light was used to induce sporulation in some cultures. Those that failed to sporulate after 1 month were considered as sterile mycelia.

2.5. Statistical analysis

The variance homogeneity of the data was assessed using the PROC UNIVARIATE statement of SAS (version 9.0). Data of chemical composition of silages, in vitro fermentation kinetics, and total and toxicogenic fungal populations were analyzed using the MIXED procedure of SAS (version 9.0) by the model:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + (G \times T)_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

where Y_{ijk} is the variable to be tested, μ is the mean, G_i the fixed effect of the grain variety ($i = \text{HT or LT}$, each one with 2 genotype replicates), T_j is the fixed effect of storage time ($j = 0, 30, 90$, and 180 d), $(G \times T)_{ij}$ the interaction between genotype and storage time, and ε_{ijk} is the residual error. The farm (silo) was included as the subject for the repeated measurement, and the run was included as a random effect. Linear and quadratic effects for increasing storage time on high and low tannin-containing sorghum genotypes were also tested. The PROC GLM procedure of SAS (version 9.0) was used to compare chemical composition, in vitro fermentation, and toxicogenic fungal populations between fermented and non-fermented materials independently of storage time. Additionally, Pearson correlation and PROC CORR statement of SAS (version 9.0)

analysis were used to determine significant relationships among chemical composition and in vitro fermentation parameters with total and toxicogenic fungal populations. Significance was declared at $P < 0.05$, and tendencies at $P < 0.10$.

3. Results

The chemical composition of sorghum grains was affected differently by the storage time depending on whether the grains were high or low in tannins (grain variety \times time interaction; $P < 0.01$; Table 2). For the HT variety, DM and OM content quadratically increased up to 90 d of ensiling and decreased towards 180 d ($P < 0.01$), while for the LT variety, DM and OM decreased linearly ($P < 0.01$) at an increasing rate towards 180 d of silage. Starch content increased linearly and quadratically in HT grains ($P < 0.05$). Crude protein content increased linearly in both varieties of sorghum ($P < 0.01$), while tannin content decreased linearly, representing a decrease of 70% in HT grains and 50% in LT grains.

Overall, fermented grains had lower CT concentrations than those non-fermented (3.00 vs. 5.43 g/kg, SEM = 0.527, $P = 0.05$). A linear and quadratic response of pH to storage time was observed for both HT and LT sorghums, revealing a reduction of pH at a decreasing rate as storage time increased ($P < 0.05$).

Regarding in vitro fermentation parameters, the potential gas production was affected by the sorghum variety ($P = 0.03$), with HT sorghums producing more gas than the LT sorghums (Table 2). Both varieties and storage time altered the fractional rate of gas production (kd) ($P < 0.01$), and this parameter increased linearly with storage time for both varieties ($P < 0.05$). There were no differences between fermented and non-fermented grains (0 d vs. 30, 90 and 180 d, not shown in Table 2) in the volume of gas produced, but fermented ones produced gas more rapidly (kd 0.06 vs. 0.07 per h, SEM = 0.002, $P = 0.04$) and with a shorter lag time (2.85 vs. 2.62 h, SEM = 0.044, $P = 0.02$).

Fermented grains showed lower number of colonies of total molds (73.3 vs. 44.9, SEM = 5.849, $P = 0.03$), *Aspergillus* (18.2 vs. 6.6, SEM = 2.189, $P = 0.02$), and *Fusarium* (7.7 vs. 1.7, SEM = 0.927, $P < 0.01$) for fermented and non-fermented grains, respectively (data not shown in Table 2). The total populations of fungi and particularly those from the 3 toxicogenic genera evaluated were affected by storage time ($P < 0.01$), and there was a variety \times time interaction for *Aspergillus* and *Penicillium* number of colonies ($P < 0.01$). A linear reduction in the *Aspergillus* number of colonies in the HT variety was observed ($P < 0.01$) at a decreasing rate ($P < 0.01$), whereas a linear increase in *Penicillium* isolation was detected in the LT sorghums ($P < 0.01$). Quadratic effects were also observed for all the fungal populations in the HT genotypes ($P < 0.05$) and in the total and *Fusarium* isolations in the LT genotypes ($P < 0.05$; Table 2).

Total molds and *Fusarium* populations were positively correlated with the DM ($P < 0.01$) and CP content of silages ($P < 0.01$), while a negative correlation was found between *Aspergillus* number and CP content of silages ($P < 0.05$; Table 3). The ADF content was positively correlated with *Aspergillus* number of colonies ($P < 0.05$), but this correlation was negative for *Penicillium* number of colonies ($P < 0.05$). Starch content was positively correlated with total molds ($P < 0.05$) and *Penicillium* number of colonies ($P < 0.01$). The CT content was negatively correlated with *Fusarium* and *Penicillium* number of colonies ($P < 0.05$) and tended to be negatively correlated with total mold number of colonies ($P = 0.08$), but this correlation was positive for *Aspergillus* number of colonies ($P < 0.01$). Positive correlations were also found between silage pH and total

Table 2

Effect of storage time on chemical composition, in vitro fermentation parameters, and total and toxicogenic fungal populations of ground sorghum grain containing high and low tannin contents.

Item	HT				LT				SEM ¹	P-value ²			HT P-value ³		LT P-value ⁴	
	0 d	30 d	90 d	180 d	0 d	30 d	90 d	180 d		G	T	G × T	L	Q	L	Q
DM, g/kg	730	773	808	757	786	772	785	736	47.2	0.97	<0.01	<0.01	0.28	<0.01	<0.01	0.06
Chemical composition, g/kg DM																
OM	977	983	983	982	981	981	981	975	1.9	0.50	<0.01	<0.01	0.08	<0.01	<0.01	0.05
aNDF	215	215	205	194	187	168	224	198	2.0	0.37	0.69	0.37	0.50	0.97	0.23	0.21
ADF	99.0	64.1	109.4	83.4	54.8	71.3	75.1	63.8	7.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.94	0.34	0.70	0.13
Starch	641	629	628	697	693	671	740	698	13.1	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.02	0.32	0.07
CP	78.6	79.0	82.5	84.2	87.7	90.6	91.9	99.9	7.26	0.27	<0.01	<0.01	<0.01	0.38	<0.01	0.36
CT	10.05	7.35	5.75	3.00	0.80	0.80	0.70	0.40	0.540	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.23	<0.01	0.26
pH	5.42	4.43	4.50	4.54	5.53	4.44	4.04	4.48	0.380	0.85	<0.01	0.22	0.02	<0.01	0.03	<0.01
In vitro parameters ⁵																
a, mL/g DM	333	325	334	329	310	313	319	294	13.6	0.03	0.70	0.84	0.92	0.88	0.42	0.39
kd, per h	0.065	0.079	0.073	0.082	0.054	0.047	0.067	0.071	0.0005	<0.01	<0.01	0.07	0.01	0.71	0.01	0.74
L, h	2.63	2.40	2.46	2.51	2.43	2.71	2.59	2.49	0.373	0.70	0.10	0.66	0.61	0.15	0.93	0.61
Fungal populations (Number isolated)																
Total molds	56.0	25.5	34.5	64.0	90.5	38.0	40.0	67.0	28.02	0.71	<0.01	0.42	0.15	<0.01	0.68	0.01
<i>Fusarium</i>	3.0	0.0	0.0	1.5	12.5	3.0	0.5	5.0	3.82	0.41	<0.01	0.06	0.58	0.01	0.16	<0.01
<i>Aspergillus</i>	35.5	14.0	3.0	4.5	1.0	17.0	1.0	0.0	6.43	0.239	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.14	0.44
<i>Penicillium</i>	12.5	4.0	6.0	14.5	3.5	14.0	15.0	28.5	4.39	0.220	<0.01	<0.01	0.17	<0.01	<0.01	0.94

HT = high-tannin; LT = low-tannin; DM = dry matter; OM = organic matter; aNDF = neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash; ADF = acid detergent fiber expressed inclusive of residual ash; CP = crude protein; CT = condensed tannins.

¹ SEM, standard error of means ($n = 16$).

² Level of significance of the genotypes (G), the silage time (T) and genotypes by silage time interaction.

³ Level of significance of the lineal (L) and quadratic (Q) effect of HT genotypes.

⁴ Level of significance of the lineal and quadratic effect of LT genotypes.

⁵ a, potential gas production; kd, fractional rate of gas production; L, gas production lag time.

Table 3

Correlations between chemical composition, fermentation parameters, and fungal population.

Item	SP	Total molds	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
DM	<i>r</i>	0.375**	0.429**	-0.151	-0.031
ADF	<i>r</i>	-0.026	-0.116	0.348*	-0.309*
Starch	<i>r</i>	0.286*	0.200	-0.218	0.682***
CP	<i>r</i>	0.432**	0.469***	-0.336*	0.209
CT	<i>r</i>	-0.259	-0.287*	0.390**	-0.347*
pH	<i>r</i>	0.775***	0.792***	0.489***	-0.119
a	<i>r</i>	-0.163	-0.096	0.268	-0.119
kd	<i>r</i>	-0.182	-0.400*	-0.213	0.037
L	<i>r</i>	0.080	0.245	-0.081	-0.250

SP = statistical parameters; DM = dry matter; ADF = acid detergent fiber; CP = crude protein; CT = condensed tannins; a = potential gas production (mL of gas/g DM incubated); kd = fractional rate of gas production (per h); L = gas production lag time (h).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

molds, *Fusarium*, and *Aspergillus* number of colonies ($P < 0.01$). Regarding the fermentation parameters, a negative correlation between the rate of gas production and *Fusarium* number of colonies was observed ($P < 0.05$).

4. Discussion

While the effect of the variety was evident only for some chemical components, the length of the storage period affected all the chemical composition parameters in the silos, except for the aNDF content. It is notable that the effects of fermentation and storage time led to a decrease in CT concentrations, which was more evident in HT than in LT sorghums. The effect of silage fermentation in reducing sorghum tannin content has been previously reported in other studies (Patricio et al., 2006; Gollcher et al., 2010; Aguerre et al., 2015). This decrease in tannin content can be related to the acidic environment and the anaerobic microbial activity within the silo, inactivating the condensed tannins, which are

depolymerized to low molecular weight compounds in acidic media (Lopes et al., 2017). This is a beneficial effect since the inactivation of tannins improves the digestive utilization of sorghum grains (Mitaru et al., 1984; Aguerre et al., 2015). In fact, in the present study, fermented grains had a lower lag time and produced gas faster, in comparison with the grains at harvest.

The variety of sorghum affected the volume of gas production. According to results of other studies, the fermentability of sorghum grains of LT varieties is higher than that of HT varieties (Hibberd et al., 1982; Gemeda and Hassen, 2015), as tannins decrease the fermentability of feeds. Surprisingly, in our study, the volume and rate of gas production were higher in the HT variety than in the LT, even before ensiling (d 0). This effect was not expected, considering that HT variety had a lower starch content and a higher fiber content than LT grains. Probably, characteristics of components not evaluated in this study, such as the amylose amylopectin ratio, could explain these differences.

The rate of fermentation was also influenced by storage time. A longer storage time favored the rate of gas production observed, which may be related to higher speeds of ruminal fermentation and microbial growth. These results suggest that the silage process could produce a higher availability of substrates than that observed in the unfermented grains. Similar reports were proposed in other studies where in vitro gas production of fermented sorghum grains was measured (Aguerre et al., 2015). Cummins (1971) reported that the increase in the in vitro DM digestibility of sorghum silages was greater in the high-tannin (HT) hybrids than in the low-tannin ones. In our study, digestibility of grains was not evaluated, but different responses on in vitro fermentation between LT and HT grains were not detected (no interaction). This result could indicate that the difference observed in the rate of fermentation derived from ensiling is not explained by tannins.

Total fungal and toxicogenic populations were affected by fermentation and storage time. *Penicillium* colonies increased with storage time, being more pronounced in LT grains. However,

Aspergillus colonies decrease with storage in both varieties. During storage, *Aspergillus* and *Penicillium* are the main contaminants and producers of mycotoxins. In addition, some *Aspergillus* species may be found before harvest (Scudamore and Livesey, 1998). As storage time increased, a decrease in *Fusarium* populations was observed. Considering the fermentation characteristics and the storage time of the grains, it would seem that the optimal storage time would be 180 d, but if we consider the fungal populations measured, the optimal moment is at 90 d.

Populations of total fungi and *Fusarium* were positively correlated with DM, starch, CP, and pH. In general, a higher level of moisture in the grains favors the silage process, with a higher production of organic acids that decrease fungal growth within the silo (Baron et al., 1986). The pH values decreased and maintained in a range expected for wet silage sorghum grains. Rowe et al. (1999) claim that the lactic acid produced in stored grains under anaerobiosis silage conditions reduced the pH, and thus helps to preserve the quality of the grains. The fact that *Fusarium* and *Penicillium* were negatively correlated with CT concentrations would indicate that higher tannin levels in sorghum grains reduce fungal contamination. This was not observed for *Aspergillus*, probably because of the high contamination prior to silage. In this sense, one of the agronomic advantages of HT sorghum is given by the protective effect of these compounds against fungal contamination (Harris and Burns, 1973; Waniska, 2000). The presence of condensed tannins in combination with phenolic acids and flavan-4-ols would be responsible for the resistance to fungi in mature grains (Jambunatham et al., 1992; Menkir et al., 1996). However, in other studies, the resistance to fungal contamination in sorghum grains is considered to be related with both HT and LT varieties (Bandyopadhyay et al., 1988; Jambunatham et al., 1992).

5. Conclusions

This work confirms a beneficial effect of storage time for 180 d of moist sorghum grains in silo bags, reducing the concentration of condensed tannins, increasing the fermentation speed of the grains and minimizing fungal contamination, both in high and low tannin varieties. It seems that 180 d of storage would be the ideal to improve the ruminal utilization of the grains, although 90 d of storage seems to be the optimal time to minimize contamination by the species of fungi evaluated.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, Uruguay and Cooperativa Nacional de Productores Lecheros (CONAPROLE), Uruguay. The authors want to thank Alejandra Capelli, Rosmari Domínguez, Santiago Sosa, Alejandro Britos, Martín Aguerre, Ismael Hugo, Rafael González, Deborah Basilio, Juan José Orihuela, Juan Ignacio Dellepiane, and Fernando Alegre for assistance with sampling.

References

Aguerre M, Cajarville C, Repetto JL. Impact of water addition, germination, ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. *Anim Feed Sci Technol* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.016>.

- Alonso V, Pereyra C, Keller L, Dalcerro A, Rosa C, Chiacchiera S, Cavaglieri L. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J Appl Microbiol* 2013. <https://doi.org/10.1111/jam.12178>.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Methods of analysis*. 16th ed. Gaithersburg, MD, USA: 3rd Revision; 1997.
- Balogun RO, Rowe JB, Bird SH. Fermentability and degradability of sorghum grain following soaking, aerobic or anaerobic treatment. *Anim Feed Sci Technol* 2005. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.01.005>.
- Bandyopadhyay R, Mughogho LK, Prasada Rao KE. Sources of resistance to sorghum grain molds. *Plant Dis* 1988;72:504–8.
- Baron VS, Stevenson KR, Buchanan-Smith JG. Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. *Can J Anim Sci* 1986;66:451–61. <https://doi.org/10.4141/cjas86-047>.
- Cheli F, Campagnoli A, Dell'Orto V. Fungal populations and mycotoxins in silages: from occurrence to analysis. *Anim Feed Sci Technol* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.01.013>.
- Cummins DG. Relationship between tannin content and forage digestibility in sorghum. *Agron J* 1971. <https://doi.org/10.2134/agronj1971.00021962006300030046x>.
- Gemeda BS, Hassen A. Effect of tannin and species variation on in vitro digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. *Asian-Australas J Anim Sci* 2015. <https://dx.doi.org/10.5713/ajas.14.0325>.
- Gollcher AMR, Lima JAF, Fialho ET, Rodrigues PB, Lima RR. Comparison between two methods for estimating the digestibility of starch and other nutrients in high moisture sorghum grain silage in horses. *Rev Bras Zootec* 2010. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010000600013>.
- González-Pereyra M, Chiacchiera S, Rosa C, Sager R, Dalcerro A, Cavaglieri L. Comparative analysis of the microbiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. *J Sci Food Agric* 2011. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4336>.
- Harris H, Burns R. Relationship between tannin content of sorghum grain and preharvest seed molding. *Agron J* 1973. <https://doi.org/10.2134/agronj1973.00021962006500060033x>.
- Hibberd CA, Wagner DG, Schemm RL, Mitchell Jr ED, Hintz RL, Weibel DE. Nutritive characteristics of different varieties of sorghum and corn grains. *J Anim Sci* 1982. <https://doi.org/10.2527/jas1982.553665x>.
- Huntington GB. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J Anim Sci* 1997. <https://doi.org/10.2527/1997.753852x>.
- Jambunatham R, Kherdekar M, Stenhouse J. Sorghum grain hardness and its relationship to mold susceptibility and mold resistance. *J Agric Food Chem* 1992. <https://doi.org/10.1021/jf00020a023>.
- Jonathan SG, Esho EO. Fungi and Aflatoxin detection in two oyster mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* from Nigeria. *Electron J Environ Agric Food Chem* 2010;9(11):1722–30.
- Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, the Netherlands: CBS; 2002.
- Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium laboratory manual*. Ames, Iowa, USA: Blackwell Professional; 2006.
- Lopes ABRC, Tse MLP, Silva AMR, Trindade Neto MA, Pereira SC, Saleh MAD, Berto DA. High-moisture sorghum grain silage with low- and high-tannin contents for weaning piglets. *Ciência Rural* 2017. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255>.
- Makkar HPS. Quantification of tannins in tree foliage. A laboratory manual for the FAO/IAEA Co-ordinated. Research project on 'use of nuclear and related techniques. Vienna, Austria: FAO/IAEA Working Document. IAEA; 2000. <http://www.naweb.iaea.org/nafa/aph/public/pubd31022manual-tannin.pdf>. [Accessed 15 May 2018].
- Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, Theodorou MK. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim Feed Sci Technol* 1999. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4).
- Menkir A, Ejeta G, Butler L, Melakeberhan A. Physical and chemical kernel properties associated with resistance to grain mold in sorghum. *Cereal Chem* 1996;73:613–7.
- Mertens DR. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J AOAC Int* 2002;85:1217–40.
- Mitaru BN, Reichert RD, Blair R. Kinetics of tannin deactivation during anaerobic storage and boiling treatment of high tannin sorghum. *J Food Sci* 1984. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12845.x>.
- Mould FL, Morgan R, Kliem KE, Krystallidou E. A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim Feed Sci Technol* 2005. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.002>.
- Nelson PE, Tousson TA, Marasas WFO. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania: University Park: Pennsylvania State University Press; 1983.
- Offner A, Bach A, Sauvant D. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Anim Feed Sci Technol* 2003. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00038-5).
- Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. *J Anim Sci* 1997. <https://doi.org/10.2527/1997.753868x>.
- Patrício VMI, Furlan AC, Moreira I, Martins EN, Jobim CC, Costa C. Avaliação nutricional da silagem de grãosúmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo de

- taninos para leitõesna fase de creche. *Rev Bras Zootec* 2006. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000500021>.
- Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int J Food Microbiol* 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>.
- Rowe JB, Choct M, Pethick DW. Processing cereal grains for animal feeding. *Aust J Agric Res* 1999. <http://www.publish.csiro.au/nid/40/paper/AR98163.htm>.
- Scudamore KA, Livesey T. Occurrence and significance of mcotoxins in forage crops and silage: a review. *J Sci Food Agric* 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199805\)77:1<1::AID-JSFA9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<1::AID-JSFA9>3.0.CO;2-4).
- Schofield P, Mbugua DM, Pell AN. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim Feed Sci Technol* 2001. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0).
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Waniska RD. Structure phenolic compounds and antifungal proteins of sorghum caryopses. In: Technical and Institutional options for sorghum grain mold management: proceeding of an International consultation, 18–19 May 2000. Patancheru, India: ICRISAT; 2000. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.11.602.8474&rep=rep1&type=pdf>.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Running title: Moisture content, tannin, time and fungi in sorghum grains storage

RESEARCH NOTE

How do Time, Tannin and Moisture Content Influence on Toxicogenic Fungal Populations during the Storage of Sorghum Grains?

Carmen García y Santos^{1*}, Cecilia Cajarville², Gonzalo Suárez³, Lina Bettucci⁴

Key words: mycotoxins, storage time, tannin content, moisture content.

¹*Laboratorio de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplaces 1550, PC 11.600, Montevideo, Uruguay*

²*Instituto de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Ruta 1, km 42.200, PC 80.100, San José, Uruguay*

³*Unidad Farmacología y Terapéutica, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplaces 1550, PC 11.600, Montevideo, Uruguay*

⁴*Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Julio Herrera y Reissig 565, PC 11.300, Montevideo, Uruguay*

*Corresponding author.

Email addresses: cgarciaysantos@gmail.com (C. García y Santos)

27 Cereal grains are usually ensiled to improve their nutritional value and are one of the main
28 sources of feed for dairy cattle. However, during storage, grains can be contaminated with toxicogenic
29 fungi. *Sorghum* is one of the most economically important cereals in the world. Therefore, the aim of this work was to evaluate the influence of storage duration and tannin and moisture contents on toxicogenic fungal populations in sorghum grain storage. Samples were prepared with variety high in tannins (genotypes Morgan 108 and ACA 558, >5g/kg DM) and with variety low tannin content (genotypes Flash 10 and ACA 546, <1g/kg DM) were collected and manually compacted in experimental laboratory silos where they received different moisture content treatments, namely low (15-25%), medium (26-32%) and high (33-42%). Freshly harvest grains were analyzed at time 0 and storage grains were analyzed at different times (30, 90 and 180 days). Fungal isolation and identification were performed following conventional mycological methods. *Penicillium citrinum* (34%), *Aspergillus flavus* (60%) and *Fusarium nygmaimai* (68%) were the most abundant species. Rapid detection of aflatoxins and fumonisins in each sample was performed by ELISA according to the AOAC method, and the quantification of aflatoxin B₁ was performed by HPLC. Aflatoxins were detected in four samples with levels of 6.7-28.8 µg/kg and aflatoxin B₁ with a level of 2-14 µg/kg in pre- and post-storage grains. Fumonisins were only detected in two freshly harvested samples with levels of 500-900 µg/kg. In general, the storage time favored the increase of *Penicillium* population, instead the *Aspergillus* and *Fusarium* are reduced. Conversely the abundance of the three population was not affected by the moisture content. The results of this study show that fungal population must be analyzed at different times.

48 **Highlights**

49 Storage favored *Penicillium* colonization while freshly grains favored to *Fusarium*

50 The abundance of *Aspergillus* in high tannin grains decreased with storage time

51 Storage for 180 days constraint fungal colonization for high and low tannin grains

52 Aflatoxins and fumonisins were detected in few samples and at low levels in grains

53 Sorghum is the fifth most economically important cereal crop, with an average production
54 over the last two decades of 60.2 Mt (19). In Uruguay, over 10 years (2004/2005-2014/2015),
55 production ranged from 84700 to 238000 tons (20). In addition to being an important food, feed
56 and forage crop, sorghum also provides raw material for production of starch, fiber, dextrose
57 syrup, biofuels, and alcohol, among other products (35).

58 Historically, thousands of years ago, ancient Egyptians were known to store harvested
59 grains. In Uruguay, particularly, wet grain silage has played a preponderant role in the different
60 dairy and livestock production systems of the country. This process refers to the conservation in
61 anaerobic conditions of the harvested grain with a humidity between 23 and 40% (being the
62 optimum 28%) without prior drying (14). Since storage systems for seeds are artificial ecosys-
63 tems, maintaining their quality and nutritional value is very important, as fungal spoilage and
64 mycotoxin contamination are among the greatest risks to stored feed, such as silage (5). Fungal
65 populations interact according to certain basic principles in ecology. Growth rate, frequency,
66 and abundance of potential abilities to degrade seeds are related to both the fungal and seed
67 characteristics interacting with the environment and the ecophysiological requirements for fun-
68 gal growth (55).

69 Fungal growth on stored grains is an obvious sign of poor-quality grains in terms of dimin-
70 ished sensory quality and nutritional value (45). Mycotoxins produced by grain fungi also pose
71 a health hazard to animals and humans. Hence, grains must be safely stored after harvesting at
72 specific times of the year to ensure supply throughout the remainder of the year (39). Microbial
73 colonization of grains starts soon after grain emergence and may continue until the grain is uti-
74 lized, but the major disturbance of the ecosystem occurs as the grain is harvested and placed in
75 store, with a change from the environmental conditions occurring in the field to those in the
76 store.

77 More recently, several methods have been developed for efficient mass storage of grains.
78 Environmental control via manipulation of ecological factors at storage facilities remains a basic
79 and efficient measure to control fungal contamination in stored grains.

80 In addition to fungal spoilage, mycotoxin contamination is one of the greatest risks to
81 stored feed, such as silage. The mycotoxins in stored grains are produced by three genera: *As-*
82 *pergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* (16). However, sorghum, unlike other cereals, does not yet
83 have legislation that regulates the maximum content of mycotoxins in grains for its commercial-
84 ization (9).

85 García y Santos et al. (24), in a previous study, found that for moist sorghum grains stored
86 in silo bags, along storage time of 180 days was beneficial in terms of decreasing toxicogenic
87 fungal populations, particularly on high-tannin grains. Consequently, the aim of this work was
88 to study the effects of different times, tannins, and moisture contents on the abundance of the
89 main mycotoxigenic fungi colonizing freshly harvested and stored sorghum grains to select the
90 best conditions to reduce grain spoilage. As mycotoxins in food and feed are one of the main
91 food safety problems worldwide, this work also provides an examination of the occurrence of
92 mycotoxins in freshly harvested and stored sorghum grains.

93 MATERIALS AND METHODS

94 *Sampling procedure and silo grain treatments*

95 Samples of *Sorghum* varieties with condensed tannins low and high were collected im-
96 mediately before the start of the ensiling process from five commercial farms located in San
97 Jose, Flores and Canelones Departments (33°33'28.3" S 56°52'37.7" W and 34°31'07.5" S
98 56°32'21.1" W) at the southcentral region of Uruguay. The rainfall during the sorghum growing
99 period (April-June) was 300 mm, like the average precipitation corresponding to these months.
100 At the time of harvesting grains contained a moisture ranging 26-32%.

101 Grains samples were collected from 5 farms selected in the previous study according to
102 the variety of *Sorghum* grains used for preparing the silages (24). Three of the farms produced
103 varieties considered with high tannin content (HT, tannin concentration > 5g/kg DM). Within

104 these, farm 1 produced genotype Morgan 108 (12.3 g/kg DM of tannin), and farms 2 and 3 pro-
105 duced ACA 558 (7.8 and 5.6 g/kg DM of tannin, respectively). The other two farms produced
106 varieties considered with low tannin contents (LT, tannin concentration < 1g/kg DM). Within
107 these, farm 4 produced genotype Flash 10 (0.9 g/kg DM of tannin), and farm 5 produced ACA
108 546 (0.7 g/kg DM of tannin).

109 From each of the 5 farms, 30 kg of grains were collected, (in total 150 kg); from them 3
110 kg (in total 15 kg) of fresh harvest grains, containing a moisture ranging 26-32% were mixed,
111 homogenized and the mycological analysis performed (time 0). The remainder 135 kg of grains
112 was manually compacted under laboratory conditions. In field conditions Uruguay wet sorghum
113 grains are stored by farmers in silo bags under with a wide range of moisture content (MC) 16
114 to 40% (14). As in both lower and higher MC fermentation problems have been detected, in this
115 study three ranges of MCs were used. These were namely: low (15-25), medium (26-32) and
116 high (33-42%) to evaluate which was the best MC to storage grains. At each MC 45 silos were
117 prepared.

118 Then, in total 50 samples, 5 samples of freshly harvest grains (3 of HT and 2 of LT)
119 were analyzed at time 0 (one sample from each farm) and the remaining 45 samples (27 of 3 HT
120 + 18 of 2 LT) each containing 3 different moisture levels. Silos were opened at 3 times (30, 90
121 and 180). The experimental silos (46), that consisted of plastic containers (Polypropylene ran-
122 dom copolymer, ATMA®, Uruguay) were of 3 kg capacity, white, round, 12 cm high and 20
123 cm in diameter, according to the methodology proposed by Aguerre et al. (3) and Brambillasca
124 et al. (12). Silos were hermetically closed and sealed. At each storage time (30, 90 and 180
125 days), they were weighed to evaluate if variation of the moisture content had occurred. If the
126 variation ranged between 0-1 %, it was considered that modifications in moisture content was
127 unnecessary. For mycological analysis silos were opened, grains were randomly collected and
128 afterwards they were discarded.

129 *Chemical analyses*

130 The moisture content was determined using official method 925.09 (7). A crucible was
131 dried in an oven at 105°C for 1 hour and placed in desiccators to cool. Condensed tannins were
132 determined with the butanol-HCl method described by Makkar (38).

133 *Mycological analysis*

134 For fungal isolation, 100 grains of sorghum from each sample were randomly selected,
135 surface disinfection in a 0.4% solution of NaOCl for 1 min, rinsed three times with sterile dis-
136 tilled water, and dried with sterile absorbent paper. Seeds were subsequently placed in Petri
137 dishes containing potato dextrose agar (Sigma-Aldrich, 70139), plates were incubated at 25 °C
138 for 7 to 10 days. At the end of this period, the resulting colonies were transferred to selective
139 culture media for isolation: Czapek yeast extract Agar supplemented with the antibiotics BC-
140 RB for *Aspergillus* spp. (15); AFPA for *Aspergillus flavus* group (50) and CZID for *Fusarium*
141 spp. (2, 34, 58). The identification was performed according to the available guides for *Asper-*
142 *gillus* spp. (30); for *Aspergillus flavus* group (50); for *Penicillium* spp. (45, 49, 51, 61) and for
143 *Fusarium* spp. (6, 13, 27, 28, 33, 44).

144 The isolation frequency and the relative abundance of genera or species were calculated
145 according to McMullen and Stack (40) for each tannin content, moisture content and storage
146 time: the relative frequency as the number of samples of occurrence/total number of samples
147 and the relative abundance as the number of isolates of a fungal taxon/total number of isolates.

148 *Analysis of mycotoxins in sorghum grains*

149 Rapid detection of aflatoxins (AFs) in triplicate from each sample was performed by ELI-
150 SA using the Ridascreen® Fast Aflatoxin SC (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) commer-
151 cial kit, according to the AOAC method (8). Approximately 2 g of each sample was disintegrat-
152 ed, weighed and extracted with 10 mL of a methanol-water mixture (7+3) to separate aflatoxins.
153 Sample extract (100 µL) and HRP enzyme conjugate (100 µL, diluted in 1% BSA in PBS) were
154 added to the antibody-coated wells, and the mixed solution was incubated for 60 min. After
155 washing with PBS/T, substrate/chromogen solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine/hydrogen
156 peroxide in acetate buffer, pH 5.5, 100 µL) was added to all testing wells, and the plate was

157 incubated for 30 min. The plate was read in a dual wavelength mode (450/650 nm) after stop-
158 ping the color development with 1.25 M sulfuric acid (50 μ L). For the control and blank wells,
159 16% methanol and diluted sample extract were used for their respective standard curves. The
160 final absorbance was calculated by subtracting the absorbance of the corresponding blank wells
161 (background color). The limit of detection of AFs (ELISA) was 2 μ g/kg and the range of detec-
162 tion 2-100 μ g/kg.

163 Aflatoxin B₁ (AFB₁) standard or undiluted sample extract (50 μ L) and HRP enzyme conju-
164 gate (100 μ L, diluted in 1% BSA in PBS) (in a direct assay) or a coating antigen (in an indirect
165 assay) were prepared from a hapten that is structurally similar but not identical to that used for
166 antibody production. Detection and quantification of AFB₁ in triplicate from each sample was
167 performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to the methodology
168 proposed by Trucksess et al. (59). 25 g of sample and 100 mL of acetonitrile: water (84:16 v / v)
169 were placed in a high-speed blender for 3 minutes. The mixture was filtered through Whatman®
170 # 4 filter paper and a 5 mL aliquot of this filtrate was passed through a MycoSep® 224 cleaning
171 column (Romer Labs® Inc., Union, MO, USA). Two mL of this extract was brought to dryness
172 and then resuspended in 400 μ l of water: methanol: acetonitrile at (4:1:1 v/v). An aliquot
173 (200 μ L) was derivatized with 700 μ L of trifluoroacetic acid-acetic acid-water (20: 10:70, v/v).
174 Chromatographic separations were performed on a reverse-phase column (Silica Gel, 150 \times
175 4.6 mm id., 5- μ m particle size, VARIAN, Inc. Palo Alto, USA). Methanol-water (60:40 v/v)
176 was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The fluorescence of AF derivatives
177 was recorded at λ 360 nm and λ 460 nm. Standard curves were constructed with different levels
178 of AFB₁. This toxin was quantified by correlating the peak heights of the sample extracts with
179 those of standard curves. The recovery of AFB₁ range was 73-98%, the range of detection 0.02-
180 2 μ g/kg, the range of quantification 0.05 μ g/kg-5 μ g/kg and the limit of quantification de AFB₁
181 0.05 μ g/kg (21). The detection limit of the analytical method was 0.4 μ g/kg (48). Uruguay fol-
182 lows the limits determined by the common legislation of countries constituting the MER-
183 COSUR, where the maximum limit of aflatoxins allowed is 20 μ g/kg for corn destined for dairy

184 cow consumption (41). Moreover, the Ministry of Livestock, Agriculture, and Fisheries of Uru-
185 guay recommends the maximum limit of 5 µg/kg for AFB₁ in diets intended for dairy cows, as
186 indicated by European Union regulation (22).

187 Fumonisin analysis was performed by ELISA using the Ridascreen® Fast Fumonisins (R-
188 Biopharm AG, Darmstadt, Germany) commercial kit. Approximately 5 g of ground sample was
189 weighed and extracted with 25 mL of methanol–water mixture (7+3) to separate fumonisins in
190 each one of triplicate. The sample extract was shaken vigorously for three min with a shaker,
191 filtered through Whatman No. 1 filter paper and diluted 1:14 (1+13) with distilled water. Then,
192 50 µL was added to each microtiter well with equal volumes of enzyme conjugate and anti-
193 fumonisin antibody solution, and the mixture incubated for 10 min. After washing, 100 µL of
194 substrate/chromogen solution were added to the well, mixed and incubated for 5 min in the
195 dark. The reaction was stopped with 100 µL of 1 N sulfuric acid. The detection limit of
196 fumonisins (ELISA) was 0.222 mg/kg and the range of detection: 0.222-6 mg/kg according to
197 the manufacturer's specifications.

198 *Statistical analysis*

199 The relative frequency of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* isolates was evaluated
200 by chi-square and Fisher's analysis. The relative abundance of fungi and mycotoxins were de-
201 termined by the logistic regression model to evaluate the association between the study varia-
202 bles. Split-plot designs were analyzed for each grain variety (HT or LT) using the generalized
203 linear mixed model in R version (R Core Team, 2021) (53). Interactions between moisture con-
204 tent and storage time were including as a fixed effect. The moisture content (high, medium and
205 low) was considered by main plot and the freshly harvest (time 0) and storage time (30, 90 and
206 180 days) were considered by split plot. Significance was declared at $P < 0.05$.

207 **RESULTS**

208 The presence of fungi was observed in 49 out of 50 sorghum samples. The most fre-
209 quent fungi isolated in the total samples analyzed of freshly harvested and stored samples corre-
210 sponded to *Penicillium* spp. (88%), *Aspergillus* spp. (70%) and *Fusarium* spp. (18%).

211 As shown in Table 1, the frequencies of all fungi increased from freshly harvested
212 grains (time 0) up to 30 days of storage and gradually decreased over the time until the end of
213 the period (day 180); only *Fusarium* showed a statistically significant difference along the time
214 ($P = 0.04$) (Table 1).

215 The distribution of species inside each genus reflected that one species was dominant,
216 considering fresh harvested and storage samples, and several were rare. *A. flavus* (60%) was the
217 most abundant species of *Aspergillus*, and *A. fumigatus* (14%), *A. niger* (14%), *A. candidus*
218 (6.5%) and *A. clavatus* (3.5%) were present with lower abundance and as rare species, along
219 with *A. ochraceus* (1.1%) and *A. niveus* (0.6%). *F. nygamai* (68%) was the most abundant spe-
220 cies of *Fusarium*, with *F. graminearum* (26.4%) present with lower abundance and *F. tricinctum*
221 (2.8%), and *F. oxysporum* (1.4%) and *F. semitectum* (1.4%) were rare species. The isolates from
222 *Penicillium*, corresponding to *P. citrinum* (34%), were the most abundant species of this genus
223 present in all samples, and *P. verrucosum* (4%) was present in a few samples with low abun-
224 dance.

225 In HT and LT fresh grain samples (time 0) the relative abundance of *Penicillium* spp.
226 was lower than stored grains at 30, 90 and 180 days with the three MCs (Table 2) evidencing
227 statistically significant difference ($P < 0.01$) as it is shown in Table 3. But only the relative
228 abundance of LT grains with medium and low MC evidenced statistically significant difference
229 in relation with the grains with high MC (Table 3). If the interactions of MC and time are con-
230 sidered statistically significant difference in relative abundance can be observed in HT grains
231 with medium MC at 30 and with low MC at 90 days and in LT grains with medium MC at 30
232 days and with low MC at 30 and 180 days ($P < 0.01$).

233 The relative abundance of *Aspergillus* spp. in HT fresh samples (time 0) was higher than in
234 stored samples with the three MC, except at 30 days with high MC (Table 2), without evidence
235 of significant difference (Table 3). In LT fresh samples (time 0) the relative abundance *Asper-*
236 *gillus* was lower than at 30, 90 and 180 days of storage time with high and medium MC. But, in

237 grains with low MC at 180 days was slightly higher than in fresh harvest grains (time 0), with-
238 out significant difference. However, the effect of storage time evidenced significant difference
239 ($P < 0.01$) in the relative abundance of *Aspergillus* present in grains of both varieties. The effect
240 of MCs on *Aspergillus* spp. abundance was without any statistically significant difference (Ta-
241 ble 3). However, if interactions of MC and time are considered statistically significant differ-
242 ence in relative abundance can be observed only in HT grains with medium MC at 30 day ($P <$
243 0.01) (Table 4).

244 The relative abundance of *Fusarium* spp. in HT fresh grains (time 0) was higher than in
245 storage grains at 30, 90 and 180 days (Table 2) evidencing statistically significant difference (P
246 < 0.01) as it is shown in Table 3. Conversely, the effect of MCs on the relative abundance was
247 without any statistically significant difference (Table 3). Moisture and time interactions did not
248 occur.

249 Total aflatoxins were detected only in four of the fifty samples (8%), one from freshly har-
250 vested sample and the other three from stored samples.

251 In the freshly harvested (time 0) HT sample was detected 6.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ total AFs, and 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$
252 of AFB₁. In the three stored samples: 1) in one LT with high MC at day 90 was detected 20
253 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and AFB₁ was not detected. 2) in one LT with medium MC at day 180 was detected, 14
254 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFs and also 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁. 3) in one HT with low MC at day 180, from 28.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$
255 was detected, but AFB₁ was not detected.

256 Fumonisin was detected only in two freshly harvested samples contaminated with *Fusari-*
257 *um* that produced levels ranging from 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in HT grains to 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in LT grains, but it
258 was not detected in stored samples.

259 DISCUSSION

260 The results showed significant differences between freshly harvested grains and stored
261 grains with different moisture contents and storage times in terms of the abundance of the most
262 important toxicogenic fungi. Only the abundance of the *Penicillium* population in the LT grains

263 was affected by the moisture content, decrease in grains with medium and low MC in relation
264 with high MC. On other hand, the storage time favored the increase of *Penicillium* population,
265 instead the *Aspergillus* and *Fusarium* populations are reduced. In a previous study, it was found
266 that for moist sorghum grains stored in silo bags, for 180 days was beneficial in terms of de-
267 creasing of the three toxicogenic fungal populations, particularly on HT grains (24).

268 The main fungal contamination of sorghum grains was qualitatively comparable to that
269 found in other sorghum-producing countries worldwide (33). However, no similar quantitative
270 comparison could be established since studies investigating fungal contaminants of stored sor-
271 ghum grains for a long period of 180 days are not frequently performed. Fungi from wheat
272 grains with six months of storage time showed the presence of *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.
273 and *Fusarium* spp. as recorded here (11, 54). These fungi were associated with cereal seeds and
274 growing plants from the time the seed was sown as part of the agroecosystem to the time the
275 new seeds were harvested, transported, and stored as part of a new grain ecosystem (55).

276 The occurrence and magnitude of fungal contamination vary with conditions under which a
277 crop is grown, harvested, and stored (47). Accordingly, in the sorghum grains analyzed here,
278 *Penicillium* was favored in HT and LT grains under storage conditions, and *Aspergillus* was
279 favored in freshly harvested grains more in HT than in LT. Hence, it is important to take into
280 account the amount of precipitation in the crop season to select the moisture content of sorghum
281 grains for storage (25).

282 The infrequent contamination and low levels of AFs in the freshly harvested grain samples
283 could probably be related to rainfall values during the growing period. In stored grains, AFs
284 were absent or detected at low levels in few samples, being lowest in samples with medium
285 MC, similar to grains in fresh MC samples and highest in those with low or high MC. Converse-
286 ly, Magan and Aldred (36), under silage conditions, found that grains with low water content
287 were critical for safe storage. On the other hand, under laboratory conditions, Montani et al. (42)
288 showed that the most favorable condition for AFB₁ production in corn grains was at medium
289 MC for all incubation times, the equivalence was approximately calculated according with (37).

290 Lahouar et al. (32) found that AFB₁ production could be avoided by storing sorghum grains
291 with low water content, but the highest levels were produced with higher water content.
292 Weledesemayat et al. (62) detected AFB₁ (2.26 µg/kg) in sorghum grains with low MC. Com-
293 parison of sorghum grains moisture content percent with the water activity of other grains was
294 approximately calculated according with values shown by Magan et al. (37). These conflicting
295 results likely stem from different conditions during the sorghum growing period and at the time
296 of sampling.

297 Since stored grains are one of the main sources for dairy cow nutrition in Uruguay, aflatox-
298 icosis represents a risk for animal health considering the severe clinical signs of animal health
299 and depression impacting milk yield and feed conversion (57, 63). However, the most important
300 impact on human health is due to the metabolic transformation of AFB₁ to AFM₁ present in
301 milk (56, 60).

302 Fumonisin produced by isolates of *F. nygamai* were only detected in two freshly harvested
303 samples of HT and LT grains, corresponding to the scarce presence or absence of *F. nygamai* in
304 silage grains. According to Da Silva et al. (18), the levels of AFs and fumonisins detected in
305 fresh harvested and silage sorghum grains depend on the prevailing abiotic factors (moisture
306 content, temperature, relative humidity, and mean rainfall) during the sorghum growth period
307 and at the time of sampling.

308 It seems probable that apart from environmental conditions during preharvest and storage
309 of grains, the interactions during storage with tannin content on the abundance of fungi must not
310 be discarded. Tannins are recalcitrant resources for biodegradation, mainly due to the ability of
311 these molecules to inhibit microbial growth by binding strongly to proteins and polysaccharides
312 such as cellulose and pectin (10). Condensed tannins are more resistant to microbial decomposi-
313 tion, while hydrolysable tannins are more easily degraded by some microorganisms (17).

314 On the other hand, species *Aspergillus* and *Penicillium* are the most active microorganisms
315 capable of producing tannase (1). In animal feeding, tannase is used to reduce the antinutritional

316 effects of tannins and to improve the animal digestibility activity that is accomplished by these
317 fungi (4, 26, 43).

318 Although the results of this study have shown that few samples were contaminated with
319 low levels of mycotoxins, periodic monitoring of sorghum silage must be performed to avoid
320 animal production impairment and hazards to animal and human health (29). In addition, as
321 sorghum grains are a very important resource in Uruguay, legislation that regulates the maxi-
322 mum limits of acceptance for its commercialization is necessary (9).

323 Briefly, the results of this study showed that differences in the relative abundance of *Peni-*
324 *cillium* spp, evidence that storage conditions favored grain colonization in relation with fresh
325 grain at time 0, while *Fusarium* spp. were unfavored since colonization after 30 days of silage
326 the relative abundance decreases and, the abundance of *Aspergillus* spp. in high-tannin grains
327 decreased with the storage time. Also, low toxicogenic fungal contamination and low levels of
328 mycotoxin was detected suggesting that periodic monitoring of sorghum silage must be per-
329 formed at different times according to fungal population evolution and mycotoxin production.

330

331

ACKNOWLEDGMENTS

332 This work was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) and
333 CONAPROLE S.A. The authors want to thank Alejandra Capelli, Rosmari Domínguez, Santia-
334 go Sosa, Ismael Hugo and Rafael González, for assistance with sampling.

335

336

REFERENCES

337 1. Abdel-Naby, M., A.A. Sherief, and A.B. El-Tanash. 2011. Tannin Biodegradation and
338 Some Factors Affecting Tannase Production by Two *Aspergillus* sp. *Biotechnology (Faisala-*
339 *bad)*. 10:149-158. <https://dx.doi.org/10.3923/biotech.2011.149.158>

340

- 341 2. Abildgren, M.P., F. Lund, U. Thrane, and S. Elmholt. 1987. Czapek Dox agar containing
342 iprodione and dicloran as a selective medium for the isolation of *Fusarium* species. *Lett. Appl.*
343 *Microbiol.* 5:83-86. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1987.tb01620.x>
344
- 345 3. Aguerre, M., C. Cajarville, and J.L. Repetto. 2015. Impact of water addition, germination,
346 ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.*
347 205:75-81. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.016>
348
- 349 4. Aguilar, C.N., R. Rodríguez, G. Gutiérrez-Sánchez, C. Augur, E. Favela-Torres, L.A.
350 Prado-Barragán, A. Ramírez-Coronel, and J.C. Contreras-Esquivel. 2007. Microbial tannases:
351 Advances and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:47-59.
352 <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2>
353
- 354 5. Alonso, V. C. Pereyra, L. Keller, A. Dalcerro, C. Rosa, S. Chiacchiera, and L. Cavaglieri.
355 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J. Appl. Microbiol.* 115: 637-643.
356 <https://doi.org/10.1111/jam.12178>
357
- 358 6. Aoki, T., K. O'Donnell, and D.M. Geiser. 2014. Systematics of key phytopathogenic
359 *Fusarium* species: current status and future challenges. *J. Gen. Plant Pathol.* 80:189-201.
360 <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>
361
- 362 7. Association of Official Analytical Chemists. 2000. *Methods of Analysis* 925.10, 65.17,
363 974.24, 17th ed. AOAC, Gaithersburg.
364
- 365 8. Association of Official Analytical Chemists. 2002. *Method of Analysis* 991.3 1994, Afla-
366 toxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut. Available at:
367 http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=1723
368 Accessed 17 October 2020.

- 369 9. Astoreca, A.L., L.G. Emateguy, and T.M. Alconada. 2019. Fungal contamination and
370 mycotoxins associated with sorghum crop: its relevance today. *Eur. J. Plant. Pathol.* 155:381-
371 392. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-019-01797-w>
372
- 373 10. Bhat, T.K., B. Singh, and P.O. Sharma. 1998. Microbial degradation of tannins a current
374 perspective. *Biodegradation.* 9:343-357. <https://doi.org/10.1023/A:1008397506963>
375
- 376 11. Birck, N.M.M., I. Lorini, and V.M. Scussel. 2006. Fungus and mycotoxins in wheat grain
377 at postharvest. *Proc. Int. Work. Conf. Stored Prod. Protection.* 9. Available at:
378 <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwcsspp/pdf2/9/6281.pdf> Accessed 17 October 2020
379
- 380 12. Brambillasca, S., M. Fernández-García, M. Aguerre, J.L. Repetto, and C. Cajarville.
381 2019. Characterization of the in vitro digestion of starch and fermentation kinetics of dry sor-
382 ghum grains soaked or rehydrated and ensiled to be used in pig nutrition. *J. Cereal Sci.* 89,
383 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102817>
384
- 385 13. Burgess, L.W., B.A. Summerell, S. Bullock, K.P. Gott, and D. Backhouse. 1994.
386 Laboratory manual for Fusarium research, 3rd ed. Department of Crop Science, University of
387 Sydney, Sydney.
388
- 389 14. Chalkling, D., R. Brasesco. 1997. *Ensilaje de grano húmedo: una alternativa promisorio.*
390 Ed. Plan Agropecuario-INIA, Uruguay.
391
- 392 15. Cotty, P.J. 1994. Comparison of four media for the isolation of *Aspergillus flavus* group
393 fungi. *Mycopathologia.* 125:157-62. <https://doi:10.1007/BF01146521>
394
395

- 396 16. Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Mycotoxins: risks in plant, ani-
397 mal and human systems. CAST, Ames. Available at: [https://www.international-food-
400 safty.com/pdf/Mycotoxins%20%20Risks%20in%20Plant,%20Animals%20and%20Human%20
401 Systems.pdf](https://www.international-food-
398 safty.com/pdf/Mycotoxins%20%20Risks%20in%20Plant,%20Animals%20and%20Human%20
399 Systems.pdf) Accessed 18 September 2020.
- 402 17. Cruz-Hernández, M., J.C. Contreras-Esquivel, F. Lara, R. Rodríguez, and C.N. Aguilar.
403 2005. Isolation and Evaluation of Tannin-degrading Fungal Strains from the Mexican Desert. *Z.
404 Naturforsch. C. J. Biosci.* 60:844-848. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-11-1205>
- 405 18. Da Silva, J.B., P. Dilkin, H. Fonseca, and B. Correa. 2004. Production of aflatoxin by
406 *Aspergillus flavus* and fumonisin by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. *Braz. J.
407 Microbiol.* 35:182-186. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000200002>
- 408
- 409 19. De Bernardi, L.A. 2019. Perfil del sorgo. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.
410 Presidencia de la Nación, Buenos Aires. Available at:
411 [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/informes/perfil-de-sorgo-
413 2019.pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/informes/perfil-de-sorgo-
412 2019.pdf) . Accessed 15 October 2020.
- 414 20. DIEA. 2016. Anuario estadístico agropecuario. Ministerio de Ganadería Agricultura y
415 Pesca. DIEA, Montevideo. Available at: [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-
417 pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-diea-2016](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-
416 pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-diea-2016). Accessed 18 October 2020.
- 418 21. Elbashir, A.A., and S.E. A. Ali. 2014. Aflatoxins, ochratoxins and zearalenone in sor-
419 ghum and sorghum products in Sudan. *Food Addit. Contam. B*, 7:135-140.
420 <https://dx.doi.org/10.1080/19393210.2013.859741>
- 421

- 422 22. European Commission. 2002. Directive 2002/32/EC on undesirable substances in animal
423 feed. Off. J. Eur. Union. Available at: <https://eur-x.europa.eu/eli/dir/2002/32/oj> Accessed 17
424 October 2020.
- 425
- 426 23. Flannigan, B. 1978. Primary contamination of barley and wheat grain storage fungi.
427 *Trans. Br. Mycol. Soc.* 71:37-42. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(78\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(78)80005-9)
- 428
- 429 24. García y Santos, C., L. Bettucci, S. Brambillasca, and C. Cajarville. 2020. Storage time
430 and condensed tannin content of high-moisture sorghum grains: Effects on in vitro fermentation
431 and mold populations. *Anim. Nutr.* 6:92-97. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.08.002>
- 432
- 433 25. González, H.H.L., E.J. Martínez, and S.L. Resnik. 1997. Fungi associated with sorghum
434 grain from Argentina. *Mycopathologia.* 139:35-41 <https://doi.org/10.1023/A:1006803901969>
- 435
- 436 26. Graminha, E.B.N., A.Z.L. Gonçalves, R.D.P.B. Pirola, M.A.A. Balsalobre, R. da Silva,
437 and E. Gomes. 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nu-
438 trition. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 144:1-22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2007.09.029>
- 439
- 440 27. Hawksworth, D.L. 2012. Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a
441 period of transition. *IMA Fungus* 3:15-24. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2012.03.01.03>
- 442
- 443 28. Klaasen, J.A. and P.E. Nelson. 1998. Identity of *Fusarium nygamai* isolates with long and
444 short microconidial chains from millet, sorghum and soil in Africa. *Mycopathologia.* 140:171-
445 176. <https://doi.org/10.1023/A:1006863825469>
- 446
- 447 29. Keller, L.A.M., C.M. Pereyra, L.R. Cavaglieri, K.M. Keller, T.X., Almeida, M.V. Deve-
448 za, R.Q. Assad, and C.A.R. Rosa. 2012. Fungi and aflatoxin B1 in pre and post fermented sor-

449 ghum trench type silos destined to bovine intensive-rearing in Brazil. *Rev. Biocien.* 2:81-91.
450 <https://doi.org/10.15741/revbio.02.01.08>
451

452 30. Klich, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. CBS, Utrecht.
453

454 31. Lacey, J. 1989. Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other
455 stored products. *J. Appl. Microbiol.* 67:11-25. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb03766.x)
456 [2672.1989.tb03766.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb03766.x)
457

458 32. Lahouar, A., J. Jedidi, V. Sanchis, and S. Saïd. 2018. Aflatoxin B1, ochratoxin A and
459 zearalenone in sorghum grains marketed in Tunisia. *Food. Addit. Contam. B.* 11:103-110.
460 <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1433239>
461

462 33. Leslie, J.F. 2014. Mycotoxins in the Sorghum Grain Chain, p. 282-296. In: J.F. Leslie,
463 and A.F. Logrieco (Eds.), *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. 5th ed. John Wiley & Sons,
464 Ames. <https://doi.org/10.1002/9781118832790.ch20>
465

466 34. Leslie, J.F., B.A. Summerell. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Profes-
467 sional, Ames.
468

469 35. Machio, A. 2016. Mycoflora Compositions of Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench)
470 Grains from Eastern Region of Kenya. *J. Agric. Environ. Int. Dev.* 8:1-13.
471 <https://doi.org/10.9734/JAERI/2016/26316>
472

473 36. Magan, I., and D. Aldred. 2008. Environmental fluxes and fungal interactions: Maintain-
474 ing a competitive edge, p. 19-35. In P. van West, S. Avery, and M. Stratford (Eds.), *Stress in*
475 *Yeast and Filamentous Fungi*. Elsevier, Amsterdam. [https://doi.org/10.1016/S0275-](https://doi.org/10.1016/S0275-0287(08)80044-6)
476 [0287\(08\)80044-6](https://doi.org/10.1016/S0275-0287(08)80044-6)

- 477 37. Magan, N., D. Aldred, and E.S. Baxter. 2014. Good Post-Harvest Storage Practices for
478 Wheat Grain. Ch. 18. p. 258-267. In: J.F. Leslie, and A.F. Logrieco (Eds.), *Mycotoxin Reduc-*
479 *tion in Grain Chains*. 5th ed. John Wiley & Sons, Ames.
480 <http://doi.org/10.1002/9781118832790.ch18>
481
- 482 38. Makkar, H.P.S. 2000. Quantification of Tannins in Tree Foliage. FAO/IAEA, Vienna.
483 Available at: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/pubd31022manual-tannin.pdf>
484 Accessed 18 October 2020.
485
- 486 39. Mannaa, M., and K.D. Kim. 2017. Influence of temperature and water activity on deleterious
487 fungi and mycotoxin production during grain storage. *Microbiology*. 45:240-254.
488 <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.240>
489
- 490 40. Mc Mullen, M.P., and R.W. Stack. 1983. Fusarium species associated with grassland
491 soils. *Can. J. Bot.* 61:2530-2538. <https://doi.org/10.1139/b83-277>
492
- 493 41. MERCOSUR. 2002. Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas
494 admisibles en leche, maní y maíz. GMC/RES. N° 25/02. Available at:
495 <https://www.imo.com.uy/bases/decretos-reglamento/155-2006>
496 Accessed 15 October 2020.
497
- 498 42. Montani, M.L., G. Vaamonde, S.L. Resnik, and P. Buera. 1988. Water activity influence
499 on aflatoxin accumulation in corn. *Int. J. Food. Microbiol.* 6:349-353.
500 [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90029-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90029-3)
501
- 502 43. Murugan, K., and A. Al-Sohaibani. 2010. Biocompatible tannin and associated color from
503 tannery effluent using the biomass and tannin acyl hydrolase enzymes of mango industry solid

504 waste isolate *Aspergillus candidus* MTCC 9628. Res. J. Microbiology. 5:262-271.
505 <https://doi.org/10.3923/jm.2010.262.271>
506
507 44. Nelson, P.E., T.A. Tousson, and W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: an illustrated
508 manual for identification. Pennsylvania State University Press, Abington.
509
510 45. O'Brien, M., D. Egan, P. O'Kiely, P.D. Forristal, F.M. Doohan, and H.T. Fuller. 2008.
511 Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated
512 from baled grass silage. Mycol. Res. 112:921-932. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.023>
513
514 46. Ojeda, F., O. Caceres, and M. Esperance. 1990. *Nutrición de rumiantes: Guía*
515 *metodológica de investigación*. San José. RISPAL-IICA.
516
517 47. Osman, M.A., A. Salama, K.H.M. Naguib, M.A. Abdel-Wahhab, and S.R. Sherif. 2017.
518 Fungi and mycotoxins associated with egyptian sorghum. MOJ Toxicol. 3:51-56.
519 <http://medcraveonline.com/MOJT/MOJT-03-00052.pdf>
520
521 48. Pereyra, C., L. Cavaglieri, S. Chiacchiera, and A. Dalcerro. 2010. Fungi and Mycotoxins
522 in feed intended for sows at different reproductive stages in Argentina. Vet. Med. Int. 10:1-7.
523 <https://doi.org/10.4061/2010/569108>
524
525 49. Pitt J. I. 1979. *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and*
526 *Tamaracks*. London: Academic Press.
527
528 50. Pitt J.I., A.D. Hocking, and D.R. Glenn. 1983. An improved medium for the detection of
529 *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. J. Appl. Bacteriol. 54:109-14.
530 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01307.x>
531

- 532 51. Pitt, J.I., R.A. Samson, and J.C. Frisvad. 2000. List of accepted species and their syno-
533 nyms in the family Trichocomaceae. In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), Integration of modern
534 taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification, Harwood Academic Publish-
535 ers, Amsterdam, pp. 9-79.
- 536
- 537 52. Pitt, J.I. 2014. Mycotoxins: Ochratoxin A, Vol 2, p. 304-309. In Y. Motarjemi, G. Moy,
538 E. Todd. (Eds.), Encyclopedia of Food Safety. Elsevier, Amsterdam.
- 539
- 540 53. R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Founda-
541 tion for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- 542
- 543 54. Sinha, S.K. 1993. Response of Tropical Agroecosystems to Climate Change, p. 281-289.
544 In D.R. Buxton, R. Shibles, R.A. Forsberg, B.L. Blad, K.H. Asay, G.M. Paulsen, and R.F.
545 Wilson (Eds.), International Crop Science. Crop Science Society of America, Madison.
- 546
- 547 55. Sreenivasa, M.Y., R. Dass, and G.R. Janardhana. 2010. Survey of postharvest fungi asso-
548 ciated with sorghum grains produced in Kkarnataka (India). *J. Plant. Prot. Res.* 50:335-339.
549 <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0057-6>
- 550
- 551 56. Stoloff, L. 1980. Aflatoxin M in Perspective. *J. Food Prot.* 43:226-230.
552 <https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.3.226>
- 553
- 554 57. Sulzberger, S.A., S. Melnichenko, and F.C. Cardoso. 2017. Effects of clay after an afla-
555 toxin challenge on aflatoxin clearance, milk production, and metabolism of Holstein cows. *J.*
556 *Dairy Sci.* 100:1856-1869. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11612>
- 557

- 558 58. Thrane, U. 1996. Comparison of three selective media for detecting *Fusarium* species in
559 foods: a collaborative study. *Int. J. Food Microbiol.* 29:149-156. <https://doi.org/10.1016/0168->
560 1605(95)00040-2
- 561
- 562 59. Trucksess, M.W., F.S. Thomas, and S.W. Page. 1994. High-performance liquid chroma-
563 tographic determination of 1,1'-ethylidenebis(L-tryptophan) in L-tryptophan preparations. *J.*
564 *Pharm. Sci.* 83:720-722. <https://doi.org/10.1002/jps.2600830525>
- 565
- 566 60. Veldman, J.A.C., A. Meijs, G.J. Borggreve and J.J. Heeres-van der Tol. 1992. Carry-
567 over of aflatoxin from cows' food to milk. *Anim. Prod.* 55:163-168.
568 <https://doi.org/10.1017/S0003356100037417>
- 569
- 570 61. Visagie, C.M., J. Houbraeken, J.C., S. Frisvad, B. Hong, C.H.W. Klaassen, G. Perrone,
571 K.A. Seifert, J. Varga, T. Yaguchi, and R.A. Samson. 2014. Identification and nomenclature of
572 the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78: 343–371.
573 <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.
- 574
- 575 62. Weledesemayat, G.T., T.B. Gezmu, A.Z. Woldegiorgis, and H.F. Gemed. 2016. Study
576 on *Aspergillus* Species and Aflatoxin Levels in Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) stored for differ-
577 ent period and storage system in Kewet Districts, Northern Shewa, Ethiopia. *J. Food Sci. Nutr.*
578 2:1-8.
- 579
- 580 63. Whitlow, L.W., and W.M. Hagler. 2005. Mycotoxins in dairy cattle: Occurrence, toxicity,
581 prevention and treatment. *Proc. Southwest Nutr. Conf.* 124-138. Available at:
582 <https://www.researchgate.net/publication/237664280> Accessed 17 October 2020.
- 583
- 584
- 585

586 TABLE 1. Statistical analysis of the relative frequencies of *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. from freshly harvested and ensiled sorghum
 587 grains.

Variable	<i>Penicillium</i>				<i>Aspergillus</i>				<i>Fusarium</i>													
	High tannin		Low tannin		High tannin		Low tannin		High tannin		Low tannin											
	N	AbN = 7 PrN = 29	P	N	AbN = 1 PrN = 23	P	N	AbN = 11 PrN = 25	P	N	AbN = 4 PrN = 20	P	N	AbN = 26 PrN = 10	P	N	AbN = 19 PrN = 5	P				
MC (%)	36		>0.9		24		>0.9		36		0.3		24		36		0.5		24		>0.9	
High	3 (43%)	9 (31%)		0 (0%)	8 (35%)		3 (27%)	9 (36%)		2 (50%)	6 (30%)		10 (38%)	2 (20%)		7 (37%)	1 (20%)					
Medium	2 (29%)	10 (34%)		1 (100%)	7 (30%)		6 (55%)	6 (24%)		1 (25%)	7 (35%)		9 (35%)	3 (30%)		6 (32%)	2 (40%)					
Low	2 (29%)	10 (34%)		0 (0%)	8 (35%)		2 (18%)	10 (40%)		1 (25%)	7 (35%)		7 (27%)	5 (50%)		6 (32%)	2 (40%)					
Time(d)	36		0.4		24		>0.9		36		0.06		24		0.04		24		0.11			
0	3 (43%)	6 (21%)		0 (0%)	6 (26%)		0 (0%)	9 (36%)		0 (0%)	6 (30%)		3 (12%)	6 (60%)		3 (16%)	3 (60%)					
30	0 (0%)	9 (31%)		1 (100%)	5 (22%)		2 (18%)	7 (28%)		0 (0%)	6 (30%)		7 (27%)	2 (20%)		4 (21%)	2 (40%)					
90	2 (29%)	7 (24%)		0 (0%)	6 (26%)		4 (36%)	5 (20%)		2 (50%)	4 (20%)		8 (31%)	1 (10%)		6 (32%)	0 (0%)					
180	2 (29%)	7 (24%)		0 (0%)	6 (26%)		5 (45%)	4 (16%)		2 (50%)	4 (20%)		8 (31%)	1 (10%)		6 (32%)	0 (0%)					

588
 589 *Statistics presented: N (%); Statistical test performed: chi-square test of independence; Fisher's exact test; Ab: absence; Pr: presence; MC: moisture content;*
 590 *d: days. Numbers in bold indicate significance differences.*

591

592

593 TABLE 2. Analysis of the relative abundance of *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. from freshly harvested (time 0) and ensiled of two va-
 594 rieties of sorghum grains.

Variable	<i>Penicillium</i>			<i>Aspergillus</i>			<i>Fusarium</i>		
	High MC	Medium MC	Low MC	High MC	Medium MC	Low MC	High MC	Medium MC	Low MC
High tannin									
t0	-	0.11	-	-	0.29	-	-	0.29	-
t30	0.23	0.88	0.2	0.42	0.03	0.28	0	0	0.03
t90	0.55	0.73	0.23	0.05	0.09	0.3	0	0	0.03
t180	0.42	0.58	0.39	0.05	0.08	0.19	0	0.02	0.03
Low tannin									
t0	-	0.04	-	-	0.01	-	-	0.14	-
t30	0.37	0.02	0.04	0.21	0.08	0.04	0	0.05	0.13
t90	0.62	0.53	0.18	0.15	0.12	0.35	0	0	0
t180	0.79	0.47	0.47	0.14	0.13	0.07	0	0	0

595 *MC: moisture content (%); t: Time (days).*

596

597

598

599

600

601

602

603 TABLE 3. Statistical analysis of the relative abundance of *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. from freshly harvested (time 0) and ensiled
 604 two varieties of sorghum grains.

Variable	<i>Penicillium</i>						<i>Aspergillus</i>						<i>Fusarium</i>					
	High tannin			Low tannin			High tannin			Low tannin			High tannin			Low tannin		
	OR	95% CI	<i>P</i>	OR	95% CI	<i>P</i>	OR	95% CI	<i>P</i>	OR	95% CI	<i>P</i>	OR	95% CI	<i>P</i>	OR	95% CI	<i>P</i>
MC (%)																		
High	—	—		—	—		—	—		—	—		—	—		—	—	
Medium	2.04	0.70, 5.97	0.2	0.22	0.09, 0.56	<0.01	0.70	0.48, 1.02	0.06	0.44	0.16, 1.19	0.11	0.99	0.51, 1.91	>0.9	1.25	0.70, 2.21	0.4
Low	0.52	0.18, 1.51	0.2	0.23	0.09, 0.58	<0.01	1.18	0.84, 1.67	0.3	0.55	0.21, 1.44	0.2	1.36	0.74, 2.50	0.3	1.25	0.72, 2.15	0.4
Time (d)																		
0	—	—		—	—		—	—		—	—		—	—		—	—	
30	9.34	6.33, 13.8	<0.01	2.35	1.21, 4.59	<0.01	0.39	0.28, 0.53	<0.01	6.35	2.34, 17.2	<0.01	0.24	0.11, 0.53	<0.01	0.83	0.50, 1.38	0.5
90	14.9	10.0, 22.1	<0.01	17.7	7.81, 40.0	<0.01	0.52	0.37, 0.75	<0.01	6.7	5.35, 52.4	<0.01	0.14	0.05, 0.34	<0.01	0.00	0.00, Inf	>0.9
180	13.3	8.31, 21.2	<0.01	26.8	13.1, 55.1	<0.01	0.30	0.17, 0.51	<0.01	5.52	1.67, 18.2	<0.01	0.07	0.01, 0.50	<0.01	0.00	0.00, Inf	>0.9

605
 606 *OR*: Odds ratio; *CI*: Confidence interval; *MC*: Moisture content (%); *d*: days. Numbers in bold indicate significance differences.

607

608

609

610

611

612

613 TABLE 4. Statistical analysis of the interactions between moisture content and storage time on the relative abundance of *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp.
 614 of two varieties of sorghum grains.

MC * Time	<i>Penicillium</i>						<i>Aspergillus</i>					
	HT			LT			HT			LT		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Medium MC * t30	31.5	8.99, 110	<0.01	0.02	0.00, 0.15	<0.01	0.04	0.01, 0.16	<0.01	0.22	0.02, 2.02	0.2
Low MC * t30	1.26	0.45, 3.54	0.7	0.12	0.03, 0.53	<0.01	0.49	0.21, 1.12	0.09	0.24	0.02, 2.31	0.2
Medium MC * t90	3.03	0.91, 10.0	0.07	0.64	0.10, 4.15	0.6	3.24	0.82, 12.9	0.09	0.69	0.04, 12.7	0.8
Low MC * t90	0.12	0.05, 0.34	<0.01	0.17	0.02, 1.32	0.09	3.31	1.00, 11.0	0.05	4.79	0.31, 73.3	0.3
Medium MC * t180	3.02	0.71, 12.8	0.13	0.22	0.04, 1.30	0.10	2.40	0.24, 24.2	0.5	0.95	0.06, 14.4	>0.9
Low MC * t180	0.70	0.18, 2.64	0.6	0.15	0.03, 0.76	<0.01	5.40	0.59, 49.2	0.13	0.31	0.02, 4.55	0.4

615
 616 *OR: Odds ratio; CI: Confidence interval; HT: High tannin; LT: Low tannin; MC: Moisture content (%); t: Time days. Numbers in bold indicate significance*
 617 *differences.*

618

619

1 **Do a longer storage time improve rumen fermentation of high moisture - high tannin**
2 **sorghum grain?**

3

4

5

6 Carmen García y Santos^{a*}, Lina Bettucci^c, Cecilia Cajarville^b

7

8

9 *^aLaboratorio de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplaces*

10 *1550, Montevideo, Uruguay*

11 *^b Instituto de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República,*

12 *Ruta 1, km 42.200, San José, Uruguay*

13 *^cLaboratorio de Micología, Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería, Universidad de la*

14 *República, Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo, Uruguay*

15

16

17 *Corresponding author. EM: cgarciaysantos@gmail.com

18 **Abstract**

19 The moist sorghum grain silages are one of the most important sources of food for live-
20 stock in Uruguay and in some regions of the world. The aim of this study was to evaluate
21 the effect of variety, storage time and moisture content on the in vitro fermentation rumi-

22 nal parameters, the potential gas production (a), the fractional rate of gas production (kd)
23 and the gas production lag time (L) of moisture sorghum grain stored in experimental si-
24 los. A total of 135 experimental silos were made from two varieties of sorghum, high (HT)
25 and low tannin (LT) content, from 5 farms \times 3 moisture levels ensiled with different mois-
26 ture content levels, low (15-25%, dried at room temperature), medium (26-32%, same as at
27 harvest) and high (33-42%, moisten with distilled water) \times 3 storage time (30, 90, and 180
28 days of storage) \times 3 replica. Total gas production was higher for LT than for the HT grains,
29 regardless of storage time and moisture content. In addition, differences were noticed in
30 the interactions among tannin and moisture content and storage time and moisture content
31 for the rate of gas production. It was also observed an interaction between tannin content
32 and moisture content for the lag time. Medium moisture content promoted a higher fer-
33 mentability in HT grains, whereas high moisture promoted it in the LT grains. Fer-
34 mentability of both HT and LT grains was enhanced with a higher storage time.

35 Keywords: sorghum grains silages, condensed tannins, in vitro ruminal fermentation pa-
36 rameters, moisture content, storage time.

37 Abbreviations: DM, dry matter; MC, moisture content; CT, condensed tannins; HT, high
38 tannins; LT, low tannins; a, potential gas production; kd, fractional rate of gas production;
39 L, gas production lag time.

40 **1. Introduction**

41 Sorghum grain is considered of lower nutritional value in relation to other cereals due in
42 part to the concentration of condensed tannins in some genotypes, endosperm kaphyrins

43 and its association with starch (Schoffield et al., 2001; Offner et al., 2003). However, sor-
44 ghum has greater resistance to climatic difficulties, insect attack and fungal contamination
45 than other grains (Menkir et al., 1996; Waniska, 2000). The incorporation of high moisture
46 sorghum grain silages in live-stock systems has been a good tool for technological intensi-
47 fication (Rovira & Velazco, 2012). The increase in grain moisture and physical processing
48 improves the digestion of sorghum in ru-minants, an interesting alternative especially when
49 it comes to materials with a high concentration of tannins (Balogun et al., 2005). It is
50 known, on the other hand, that the moisture content present in the grain has an impact on
51 the fermentation process during silage. There are divergent results in the consulted bibliog-
52 raphy, the digestibility of sorghum grains ensiled with high concentrations of condensed
53 tannins with those with low concentrations. In a previous study, we found that for moist
54 sorghum grains stored in silo-bags, along storage time of 180 days was beneficial increas-
55 ing frac-tional rate of gas production, particularly on high-tannin grains (García y Santos et
56 al., 2020). For this reason and considering that the digestibility of the grains depends to a
57 great extent on their fermentation in the rumen, the objective of this study was to evaluate
58 the effect of high and low tannin varieties of ensiled sorghum grains with different moisture
59 content and time of storage, on the parameters of in vitro rumen fermentation.

60 **2. Materials and methods**

61 This study was conducted following the guidelines recommended by the Bioethics Com-
62 mittee of Animal Experimentation of the Veterinary Faculty (UdelaR, Montevideo, Uru-
63 guay).

64 2.1. Sample collection and silo grain treatments

65 Samples varieties with low and high condensed tannins of high-moisture sorghum grain
66 silages were collected immediately before the start of the ensiling process from five com-
67 mercial farms located in San Jose, Flores and Canelones Departments (33°33'28.3" S
68 56°52'37.7" W and 34°31'07.5" S 56°32'21.1" W), at the southcentral region of Uruguay.
69 At the time of harvesting, moisture content of grains ranged between 26-32%. The farms
70 were selected from a previous study according to the variety of Sorghum grains used for
71 preparing the silages (García y Santos et al., 2020): three were made with sorghum variety
72 high in tannins (HT, tannin concentration > 5g/kg DM, varieties Morgan 108 and ACA
73 558) and two made with variety low tannin content (LT, tannin concentration < 1g/kg DM,
74 varieties Flash 10 and ACA 546). The grains obtained at harvesting were ensiled in exper-
75 imental laboratory silos with three moisture content (MC) levels: low (15-25%, dried at
76 room temperature), medium (26-32%, same as at harvest) and high (33-42%, moisten with
77 distilled water). Finally, the experimental silos were opened at 30, 90 and 180 days after
78 making. From each farm, a total of 135 experimental silos were made (5 farms × 3 moisture
79 levels × 3 storage time × 3 replica; n=27 in each farm).

80 2.2. Chemical analysis

81 The moisture content was determined using official method 925.09 (AOAC, 2000). A cru-
82 cible was dried in an oven at 105°C for 1 hour and placed in desiccators to cool. Con-
83 densed tannins were determined with the butanol-HCl method described by Makkar (2000).

84 2.3. *In vitro* gas production

85 To evaluate the nutritive value of sorghum grains before and after the ensiling process,
86 fermentation kinetics of the grains were evaluated using a cumulative in vitro gas produc-
87 tion technique, according to Mauricio et al. (1999). Samples were weighed (0.5 g DM) and
88 placed in 100 mL bottles. Then, 40.5 mL of an incubation media was added to each fermenta-
89 tion bottle under a continuous CO₂ stream as described by Mould et al. (2005). After-
90 ward, bottles were sealed with butyl rubber stoppers and stored at 4 °C for 12 h to hydrate
91 substrates. Prior to inoculation, bottles were pre-warmed in a water bath at 39 °C for 2 h.
92 Then, each bottle was inoculated with 10 mL of fresh ruminal fluid from 2 cows fed a diet
93 composed of 2/3 pasture hay and 1/3 concentrates. Immediately after inoculation, flasks
94 were gassed again with a CO₂ stream; butyl stoppers were fastened with aluminum crimp
95 seals and remained in the water bath throughout the measurement period. Three bottles per
96 genotype and storage time were incubated (48 bottles containing substrate, plus three with
97 no substrate included as inoculum blanks; in total: 51 bottles), and the whole procedure was
98 conducted in two runs.

99 Gas production was measured in the bottles at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72, and 96 h
100 after inoculation using a transducer fixed to a pressure meter (840065, Sper Scientific,
101 Scottsdale, AZ, USA) and registered in psi units. Gas volume in milliliters was predicted
102 from psi values using an equation obtained in a previous trial conducted under the same
103 experimental conditions. The data for cumulative gas production were fitted to the model:
104 $V = a \times (1 - e^{-kd} \times (t-L))$, where “V” is the cumulative gas production at time t (mL/g DM
105 incubated), “a” is the potential gas production (mL/g DM incubated), “kd” is the fractional
106 rate of gas production (h⁻¹) and “L” is the gas production lag time (h).

107 2.5. Statistical analysis

108 The variance homogeneity of the data was assessed using the PROC UNIVARIATE state-
 109 ment of SAS (version 9.0). Data of in vitro fermentation kinetics were analyzed using the
 110 MIXED procedure of SAS (version 9.0) by the model:

$$111 Y_{ijk} = \mu + V_i + T_j + H_h + (V*T)_{ij} + (V*H)_{ih} + (T*H)_{jh} + (V*T*H)_{ijh} + \epsilon_{ijk},$$

112 where Y_{ijk} is the variable to be tested, μ is the mean, V_i the fixed effect of the grain varie-
 113 ty ($i = HT$ or LT), T_j is the fixed effect of storage time ($j = 0, 30, 90,$ and 180 days), H_h is
 114 the fixed effect of moisture content (low, medium and high), $(V*T)_{ij}$ the interaction be-
 115 tween variety and storage time j , $(V*H)_{ih}$ the interaction between variety and moisture con-
 116 tent, $(T*H)_{jh}$ the interaction between storage time j and moisture content h and ϵ_{ijk} is the
 117 residual error. The effect of the farm (silo) was included as a random effect. Significance
 118 was declared at $P < 0.05$.

119 **3. Results**

120 Regarding in vitro fermentation parameters, the potential gas production was affected by
 121 the sorghum variety (Table 1): the LT grains produced more volume than the HT
 122 ($P < 0.001$), independently of the storage time and the moisture content of the grains. In ad-
 123 dition, an interaction between storage time and moisture content was obtained ($P < 0.05$): the
 124 potential gas production values (a) were higher after 30 days of storage in relation to those
 125 of 180 days ($P < 0.05$) in those samples with medium MC, while at 30 and 90 days, the a
 126 values were also higher for medium MC with respect to those of high MC ($P < 0.05$). Sor-

127 ghum grains ensiled with a medium MC decreased by 30 mL of gas / g of DM incubated
128 between day 30 and 180 of storage ($P < 0.05$; Figure 1). The rate of fermentation (kd) was
129 higher in the samples with low MC, when comparing times 30 and 180 ($P = 0.002$). In the
130 samples with medium MC, they also had a higher kd ($P < 0.05$) at 180 days compared to 30
131 and 90 days. The samples with high MC did not show significant differences ($P > 0.05$).
132 When evaluating the samples with medium MC, it was observed that the kd was higher for
133 the HT varieties compared to the BT ($P < 0.05$). In the LT samples the kd showed higher
134 values with high MC in relation to the other MC. The lag time (L) presented an interaction
135 between the variety and the MC; LT sorghums presented higher L values compared to HT
136 ($P < 0.05$) when evaluating the samples with medium MC.

137 In the gas production rate (kd), interactions between the variety and the MC ($P = 0.007$) and
138 between storage time and MC ($P = 0.002$) were observed. Sorghum silage with low and me-
139 dium MC, presented higher fermentation rates at 180 days of storage in relation to 30 and
140 90 days of storage (Figure 2). Low tannin sorghum grains fermented faster when they were
141 ensiled with high MC, while HT sorghum with medium MC pre-sented a higher rate of gas
142 production than with low MC (Figure 3) showing. Finally, the lag time (L) did not change
143 as the storage time passed, but it presented a significant inter-action between the variety
144 and the moisture content of the grain. The LT sorghums ensiled with medium MC had a
145 longer L compared to the ensiled with low MC (Figure 4).

146 **4. Discussion**

147 In the present study, total volume of gas produced was higher for the LT sorghum va-rieties
148 compared to the HT ones, which agrees with previous studies that also reported superior
149 ruminal fermentation in LT sorghum grains compared to HT grains (Hibberd et al., 1982;
150 Hibberd et al., 1985; Curbelo, 2010; Gameda and Hassen, 2015). The tannins presented in
151 sorghum grains form indigestible complexes with proteins and starch, which is one of the
152 main causes that determined negative influence of high tanning content by reducing the
153 digestibility of these grains (Makkar, 2000). In turn, the arrangement and characteristics of
154 the protein matrix that cover the starch granules influence the solubility and fermentation of
155 these proteins (Van Barneveld, 1999). The protein matrix associated with the starch gran-
156 ules, the presence of condensed tannins (Huntington, 1997, Offner et al., 2003) and the
157 higher proportion of corneal endosperm, which makes the starch less digestible, make sor-
158 ghum grains considered of lower nutritional value than other cereal grains (Rooney and
159 Pflugfelder, 1986).

160 Under the conditions in which this work was carried out, although the gas volume de-
161 creased over time in the samples with medium MC, the degradation rate increased in the
162 samples with low and medium MC. We expected that the volume of gas increased with a
163 longer storage time, since it has been observed that this process has a positive effect on the
164 volume of gas produced in sorghum grains (Curbelo, 2010). On the other hand, we ob-
165 served that a longer storage time of sorghum grains increased the degradation speed, im-
166 proving their behavior. Studies comparing grains of sorghum, wheat, barley and corn,
167 found that although sorghum produced a volume of total gas similar to the other grains, the
168 degradation speed was the slowest (Lanzas et al., 2007).

169 In this study, the highest degradation speed was seen in LT grains with high MC, and in HT
170 grains with medium and high MC. This could be due to the fact that moisture content in-
171 creases the starch ruminal degradation, which causes the solubilization of the protein ma-
172 trix to increase the susceptibility of starch granules to enzymatic hydrolysis (Hibberd et al.,
173 1985). On the other hand, when the material is ensiled with low MC, the compaction is not
174 good, air spaces are formed in the bags, which leads to a loss of nutrients due to the aerobic
175 fermentation (Rovira & Velazco, 2012). The latter could explain the lower degradation
176 speed of grains with low MC, independently of the variety of grain used. Moisture favors
177 the digestibility of sorghum grains regardless of the ensilage process. This would explain
178 why the high MC samples showed a high degradation rate after 30 days of storage. In con-
179 trast, the samples with medium and low MC required longer storage time to improve the
180 gas production rate. Huck et al. (1999) demonstrated that the reconstitution of dry sorghum
181 grains (until reaching a final humidity of 25-35%) improved their digestibility, associated
182 with a greater digestion of starch, suggesting that humidity higher than 30% could favor the
183 fermentative and digestibility characteristics in ruminants.

184 Contrary to our expectations, the lag time increased in the LT varieties with medium MC,
185 compared to the LT with low MC, but although there was a statistical difference, the nu-
186 merical difference was less than 13 minutes. On the other hand, in HT grains there were no
187 variations in lag time between the different MC, and lag time was lower in HT compared
188 to LT grains. In this sense, we expected that LC presented a lower lag time than HT grains
189 as a consequence of the faster adhesion of the microorganisms in sorghum grains with a
190 less complex structure of the starch granules and of the protein matrix, as would occur in

191 LT. More studies would be necessary in this line to be able to study this effect and find an
192 explanation for it.

193 Fermentation values were also influenced by the storage time. In this experiment, a longer
194 storage time favored in vitro fermentability, an effect evidenced by increased gas produc-
195 tion and the rate of gas production, which can be related to greater ruminal fermenta-
196 tion and rapid microbial growth. This result indicates that the silage process causes a higher
197 availability of substrates than that in the unfermented grains, as has been reported in other
198 experiments where in vitro gas production of fermented sorghum grains was measured (Mi-
199 taru et al., 1984; Aguerre et al., 2015). In this sense, Cummins (1971) re-ported that the
200 increase in the in vitro DM digestibility of sorghum silages was greater in the high-tannin
201 hybrids than in the low-tannin ones, but in our study, this effect was not clear. Reichert et
202 al. (1980), observed that the storage of wet sorghum grains high in tan-nins under anaerobic
203 conditions deactivates the tannins, improving the nutritional value of these grains. This ef-
204 fect of silage on tannins would help to explain the results of this work.

205

206 **5. Conclusions**

207 High-tannin sorghums grains fermented better with medium moisture content, where-as
208 low-tannin grains fermented more with high moisture. In addition, the high and low tannin
209 sorghum grains evaluated showed better in vitro ruminal fermentation with a longer storage
210 time.

211 **Conflicts of interest**

212 The authors declare that there are no conflicts of interest.

213 **Acknowledgements**

214 This work was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC)
215 and CONAPROLE S.A. The authors want to thank Alejandro Britos, Martín Aguerre,
216 Alejandro Mendoza, Juan Ignacio Dellepiane, and Fernando Alegre for assistance with
217 sampling.

218 **References**

- 219 Aguerre, M., Cajarville, C., Repetto, J.L., 2015. Impact of water addition, germination,
220 ensiling and their association on sorghum grain nutritive value. *Anim. Feed Sci. Technol.*
221 205, 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.016>
- 222 Association of Official Analytical Chemists. 2000. *Methods of Analysis* 925.10, 65.17,
223 974.24, 17th ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- 224 Balogun, R.O., Rowe, J.B., Bird, S.H., 2005. Fermentability and degradability of sorghum
225 grain following soaking, aerobic or anaerobic treatment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120,
226 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.01.005>
- 227 Chalkling, D., 2016. *Ensilaje de Grano Húmedo*. Disponible en:
228 http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/actividades/silos/g_humedos_08.pdf

- 229 Cummins, D.G., 1971. Relationship between tannin content and forage digestibility in sor-
230 ghum. *Agron. J.* 63, 500-502. <https://doi.org/10.2134/agronj1971.00021962006300030046x>
- 231 Curbelo, A.R., 2010. Ensilaje de grano de sorgo con diferente contenido en taninos: efecto
232 sobre la composición química, degradabilidad ruminal, digestibilidad intestinal y fermen-
233 tación ruminal. Tesis Magister en Ciencias Agrarias, Orientación Ciencia Animal. Facul-
234 tad de Agronomía. Universidad de la República. Uruguay. 99 p.
- 235 García y Santos, C., Bettucci, L., Brambillasca, S., Cajarville, C., 2020. Storage time and
236 condensed tannin content of high-moisture sorghum grains: Effects on *in vitro* fermenta-
237 tion and mold populations. *Anim. Nutr.*, 6:92-97.
238 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.08.002>
- 239 Gameda, B.S., Hassen, A., 2015. Effect of Tannin and Species Variation on *in vitro* Digest-
240 ibility, Gas, and Methane Production of Tropical Browse Plants. *Asian-Australas. J.*
241 *Anim. Sci.* 28:188-199. <https://dx.doi.org/10.5713%2Fajas.14.0325>
- 242 Hibberd, C.A., Wagner, D.G., Hintz, R.L., Griffin, D.D., 1985. Effect of sorghum grain
243 variety and reconstitution on site and extent of starch and protein digestion in steers. *J.*
244 *Anim. Sci.*, 61:702-712. <https://doi.org/10.2527/jas1985.613702x>
- 245 Hibberd, C.A., Wagner, D.G., Schemm, R.L., Mitchell Jr., E.D., Hintz, R.L., Weibel, D.E.,
246 1982. Nutritive characteristics of different varieties of sorghum and corn grains. *J. Anim.*
247 *Sci.*, 55, 665-672. <https://doi.org/10.2527/jas1982.553665x>

- 248 Huntington, G.B., 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. J. Anim.
249 Sci. 75, 852–867. <https://doi.org/10.2527/1997.753852x>
- 250 Huck, G.L., Kreikemeier, K.K., Bolsen, K.K., 1999. Effect of reconstituting field-dried and
251 early-harvested sorghum grain on the ensiling characteristics of the grain and on growth
252 performance and carcass merit of feedlot heifers. J. Anim. Sci., 77:1074-1081.
253 <https://doi.org/10.2527/1999.7751074x>
- 254 Lanzas, C., Fox, D.G., Pell, A.N., 2007. Digestion kinetics of dried cereal grains. Anim.
255 Feed Sci. Technol., 136: 265-280. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.09.004>
- 256 Lopes, A.B.R.C., Tse, M.L.P., Silva, A.M.R., Trindade Neto, M.A., Pereira, S.C., Saleh,
257 M.A.D., Berto, D.A., 2017. High-moisture sorghum grain silage with low- and high-
258 tannin contents for weanling piglets. Ciênc. Rural 47: 1-7. [http://dx.doi.org/10.1590/0103-](http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255)
259 [8478cr20151255](http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20151255)
- 260 Makkar, H.P.S., 2000. Quantification of Tannins in Tree Foliage. FAO/IAEA Working
261 Document. IAEA, Vienna, Austria.
- 262 Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K.,
263 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evalua-
264 tion. Anim. Feed Sci. Technol. 79, 321-330. [https://doi.org/10.1016/S0377-](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4)
265 [8401\(99\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4)
- 266 Menkir, A., Ejeta, G., Butler, L., Melakeberhan, A., 1996. Physical and chemical kernel
267 properties associated with resistance to grain mold in sorghum. Cereal Chem., 73, 613-

- 268 617.
269 https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1996/Documents/73_613.pdf
- 270 Mitaru, B.N., Reichert, R.D., Blair, R., 1984. Kinetics of tannin deactivation during anaerobic storage and boiling treatment of high tannin sorghum. *J. Food Sci.*, 49, 1566-1568.
271
272 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12845.x>
- 273 Mould, F.L., Morgan, R., Kliem, K.E., Krystallidou, E., 2005. A review and simplification
274 of the *in vitro* incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124, 155-172.
275 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.002>
- 276 Offner, A., Bach, A., Sauvant, D., 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in
277 the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 106, 81-93. [https://doi.org/10.1016/S0377-](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00038-5)
278 [8401\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00038-5)
- 279 Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J., Gill, D.R., 1997. The effect of grain source and grain
280 processing on performance of feedlot cattle: a review. *J. Anim. Sci.*, 75, 868-879.
281 <https://doi.org/10.2527/1997.753868x>
- 282 Reichert, R.D., Fleming, S.E., Schwab, D.J., 1980. Tannin deactivation in nutritional improvement of sorghum by anaerobic storage of water-, hydrochloric acid-, or sodium hydroxide- treated grain. *J. Agric. Food Chem.*, 28 (4): 824-829.
283
284
285 <https://doi.org/10.1021/jf60230a045>

- 286 Rooney, L.W., Pflugfelder, R.L., 1986. Factors Affecting Starch Digestibility with Special
287 Emphasis on Sorghum and Corn. *J. Anim. Sci.*, 63:1607-1623.
288 <https://doi.org/10.2527/jas1986.6351607x>
- 289 Rovira, P., Velazco, J., 2012. Ensilaje de Grano Húmedo de Sorgo: Guía Práctica para su
290 uso en la alimentación de ganado en regiones ganaderas. Boletín de Divulgación N° 101,
291 INIA, Montevideo, Uruguay.
- 292 SAS Inc., 2002. SAS® User's Guide: Statistics, Version 9.0 SAS Institute Inc, Cary, NC,
293 USA.
- 294 Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: A review.
295 *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91, 21-40. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)
- 296 Van Barneveld, S.L., 1999. Chemical and physical characteristics of grains related to varia-
297 bility in energy and amino acid availability in ruminants: a review. *Aust. J. Agric. Res.*
298 50: 651-666. <https://sci-hub.se/10.1071/AR98159>
- 299 Waniska, R.D., 2000. Structure phenolic compounds, and antifungal proteins of sorghum
300 caryopses. Technical and Institutional Options for Sorghum Grain Mold Management:
301 Proceeding of an international Consultation, 18-19 May 2000, ICRISAT, Patancheru, In-
302 dia, 72-106.
303 <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.602.8474&rep=rep1&type=pdf>
304

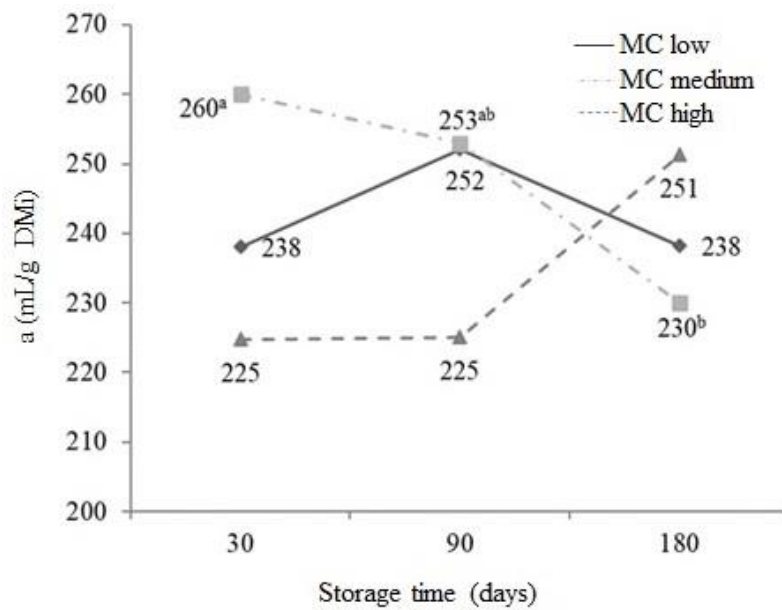
305 Table 1. Effect of storage time on chemical composition and *in vitro* fermentation parameters of ground sorghum grain containing high
 306 and low tannin contents.

Parameter	Variety				Moisture content					Storage time					P V*T	P V*H	P T*H	P V*T*H
	HT	LT	SEM	P	L	M	H	SEM	P	30	90	180	EEM	P				
a	223.3 ^b	259.7 ^a	4.64	<.001	-	-	-	5.71	0.21	-	-	-	5.71	0.89	0.67	0.06	0.03	0.63
kd	-	-	0.002	0.49	-	-	-	0.002	<.01	-	-	-	0.002	<.001	0.47	0.007	0.002	0.86
L	-	-	0.04	0.36	-	-	-	0.04	0.73	2.72	2.73	2.75	0.04	0.82	0.54	0.01	0.05	0.86

307
 308 *HT, high tannins; LT, low tannins; SEM, Standard error of means (n = 135); P, level of significance of the varieties, moisture content*
 309 *and the storage time and variety by storage time, variety by moisture content, storage time by moisture content and variety by storage*
 310 *time by moisture content interactions; L, low moisture content; M, medium moisture content; H, high moisture content; a, potential*
 311 *gas production (mL of gas/g DM incubated); kd, fractional rate of gas production (h⁻¹); L, gas production lag time (h).*

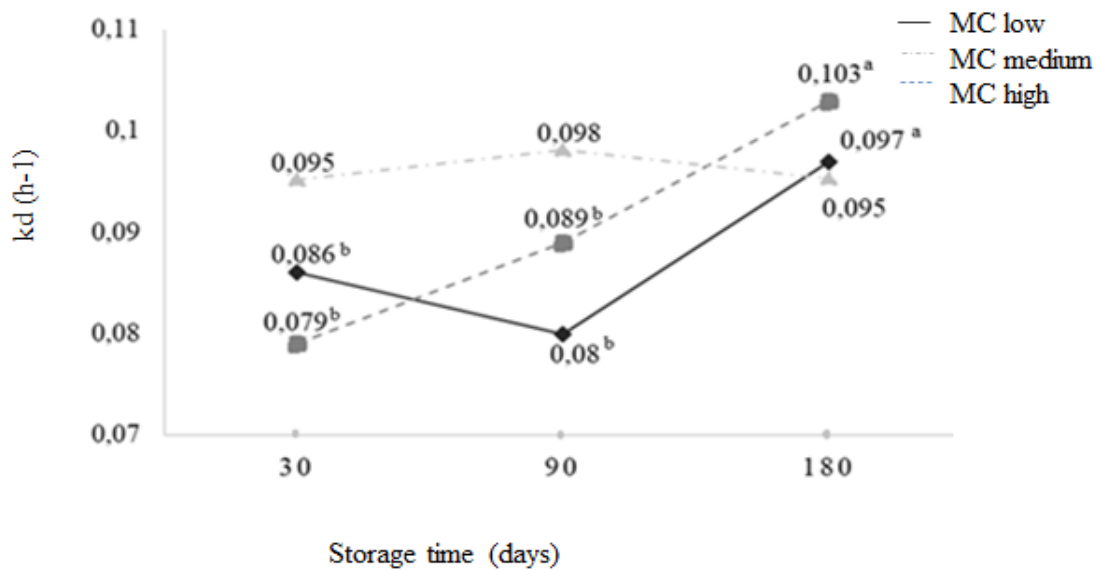
312

313



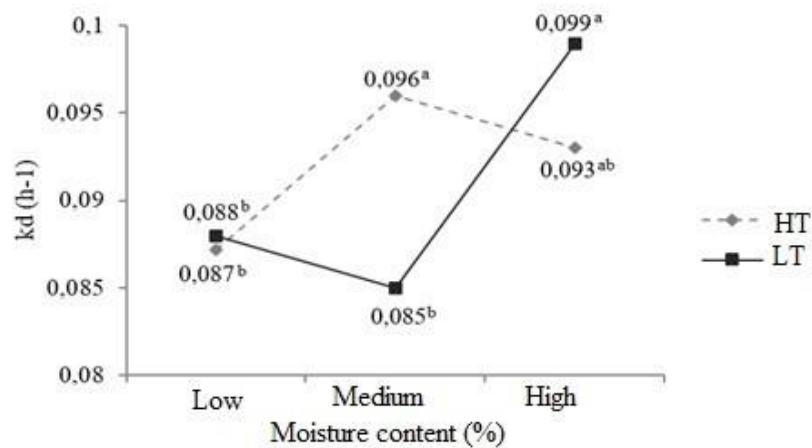
314

315 Figure 1. Effect of moisture content (low, medium and high) and storage time (30, 90
 316 and 180 days) on gas production (a). Different letters indicate significant difference
 317 within the same moisture content level).



318

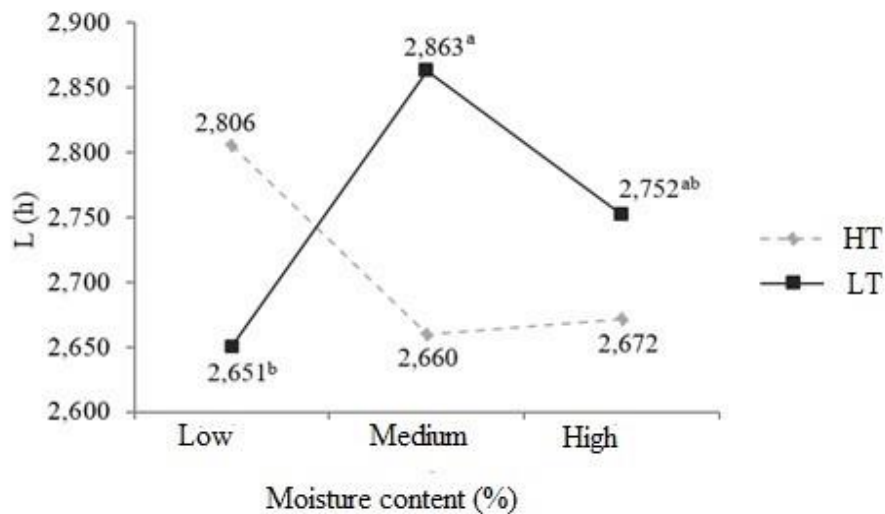
319 Figure 2. Effect of moisture content (low, medium and high) and storage time (30, 90
 320 and 180 days) on the fractional rate of gas production (kd). Different letters indicate
 321 significant difference within the same humidity range.



322

323 Figure 3. Effect of moisture content (low, medium and high) on the fractional gas
 324 production rate (kd) of sorghum grains of varieties with high (HT) or low (LT)
 325 concentrations of tannins. Different letters indicate significant difference within the
 326 variety.

327



328

329 Figure 4. Effect of moisture content (low, medium and high) on the lag time (L) of
 330 sorghum grains of varieties with high concentrations (HT) or low (LT) in tannins.
 331 Different letters indicate significant difference within the same variety.

332