

**SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y LEVADURAS A PARTIR DE  
FUENTES NATURALES Y ALIMENTICIAS PARA EL DESARROLLO DE UN  
INÓCULO APLICABLE A LA OBTENCIÓN DE ENSILAJE**

**MARGARITA MARÍA URIBE LÓPEZ**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA  
AGROINDUSTRIAL  
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL  
MANIZALES  
2016**

**SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y LEVADURAS A PARTIR DE  
FUENTES NATURALES Y ALIMENTICIAS PARA EL DESARROLLO DE UN  
INÓCULO APLICABLE A LA OBTENCIÓN DE ENSILAJE**

**MARGARITA MARÍA URIBE LÓPEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:**

**Magister en Microbiología Agroindustrial**

**Directora:**

**Mgr. PATRICIA EUGENIA VELEZ ARANGO**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA  
AGROINDUSTRIAL  
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL  
MANIZALES**

**2016**

## **DEDICATORIA**

El pilar fundamental que guía cada paso de mi vida es Dios y gracias a Él se cumple esta meta; a mi familia encabezada por mis padres que han dado su vida entera para acompañarme siempre, a mi hermano y a mi tía que también han sido fundamentales en mi camino; al ángel que me acompaña desde el cielo, para ti mi abuelita linda, a mi Mailo también.....

Y con la paciencia y voces de aliento a mis compañeros y amigos que han estado ahí durante este proceso; a Diana Marcela Arcila, Jorge Andrés Vallejo, Claudia Jaramillo, Jorge Pineda, Liliana Cardona, Luis Alejandro Uva, Milena Castro, Claudia Montoya; los llevo a todos en mi corazón y sé que se alegran por este logro en mi vida y estuvieron ahí para darme ánimos en los momentos de debilidad.

A los mosqueteros que vivieron conmigo esta experiencia única: Susan, Guido y Néstor; sin ustedes esto no hubiera sido posible; por tantos buenos y duros momentos, risas, sustos, complicidad y colaboración..... Como dice Néstor..... MUY BIEN.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Instituciones y Oficinas:**

A la empresa Soluciones Microbianas del Trópico por el apoyo y el 80% de la financiación de este trabajo de grado.

### **Universidad Católica de Manizales:**

- Rectoría, Vicerrectoría Académica y Vicerrectoría Administrativa y Financiera.
- Dirección de Investigaciones y Posgrados.
- Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial.

### **CELEMA:**

Central Lechera de Manizales por el apoyo durante el desarrollo de la Maestría.

### **FLP Procesados SAS:**

Por el acompañamiento en la etapa final de este proceso. A Alejandra Grisales González por todas las facilidades brindadas para culminar esta etapa exitosamente.

### **Doctores e investigadores:**

- Dra. Patricia Eugenia Vélez Arango, Directora del trabajo de Grado por su acompañamiento y el aporte no solo académico sino personal; por la acogida en su empresa y en su familia. Mil gracias por aparecer en el momento indicado, por tanta dedicación y paciencia, mi gratitud y admiración infinitas.
- Eliana Mendoza, por la asesoría y acompañamiento en el trabajo de campo; además de ser mi colega, mi compañera y consuelo en los momentos de fragilidad. Eli..... cuantas enseñanzas y aprendizajes para la vida profesional y personal.

- Dr. Jose Fernando Restrepo con sus asesorías y aportes en el trabajo de campo y en la elaboración del informe final.
- Mgra Dora García, docente de la Universidad de Caldas, por todos los aportes como docente y por inculcarnos siempre la dedicación y entrega al trabajo bien hecho.
- Dra. Annia Hernández, investigadora de la Universidad de la Habana, por su apoyo y orientaciones pertinentes

#### **Estudiantes de Postgrados y Compañeros:**

- Susan Natalia Cataño Valencia
- Guido Ernesto Villota Calvachi
- Néstor Fabio Holguín

#### **Agradecimientos personales**

- A todo el personal de la Empresa Soluciones Microbianas del Trópico por su apoyo y colaboración incondicional.
- A mi familia por la compañía y la ayuda ilimitada siempre.

## CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN .....	12
2	OBJETIVOS .....	14
2.1	Objetivo General.....	14
2.2	Objetivos específicos .....	14
3	REFERENTE TEÓRICO.....	15
3.1	Antecedentes .....	15
3.2	Marco teórico.....	16
3.2.1	El ensilado .....	16
3.2.2	Acción de los microorganismos .....	16
3.2.3	Fase 1: Fase Aeróbica .....	17
3.2.4	Fase 2: Fase de Fermentación .....	18
3.2.5	Fase 3: Fase Estable .....	19
3.2.6	Fase 4: Fase de Deterioro Aerobio .....	19
3.2.7	Procesos químicos y biológicos del ensilaje .....	21
3.2.8	Inóculos .....	21
3.2.9	Factores que influyen en la conservación.....	22
3.2.10	Indicadores de Calidad Fermentativa.....	22
3.2.11	Indicadores de Calidad Nutritiva.....	23
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
4.1	Ubicación .....	25
4.2	Medios de cultivo.....	25
4.2.1	Agar MRS .....	25
4.2.2	Caldo MRS.....	25
4.2.3	Agar PDA.....	25
4.2.4	Peptona.....	26
4.2.5	Caldo Extracto de Malta.....	26
4.3	Procedimientos.....	26
4.3.1	Aislamiento, identificación y selección de microorganismos lácticos. ....	26
4.3.2	Caracterización microscópica y criopreservación de aislamientos lácticos. ....	28
4.3.3	Caracterización bioquímica.....	29
4.3.4	Identificación molecular.....	30

4.3.5	Evaluación de medios de cultivo para la producción masiva de bacterias lácticas. ....	31
4.3.6	Formulación del consorcio microbiano para la obtención de ensilaje.....	34
4.3.7	Establecimiento de pruebas piloto de fermentación en fase sólida, a partir del consorcio microbiano seleccionado. ....	35
4.3.8	Ensayo 1: Industria Licorera de Caldas.....	36
4.3.9	Ensayo 2: Finca la Camelia. ....	37
4.4	Análisis de resultados .....	40
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
5.1	Aislamiento, identificación y selección de bacterias lácticas. ....	41
5.1.1	Caracterización microscópica y preservación de aislamientos. ....	41
5.1.2	Pruebas bioquímicas.....	43
5.1.3	Identificación molecular.....	46
5.1.4	Evaluación de medios de cultivo para la producción masiva de bacterias lácticas. ....	47
5.1.5	Selección del consorcio microbiano para la obtención de ensilaje .....	48
5.1.6	Fermentación en fase sólida en UPA y Maíz a partir de los consorcios microbianos seleccionados.....	49
5.1.7	Características de color textura y palatabilidad del silo a base de UPA y de Maíz.....	59
6	CONCLUSIONES .....	61
7	REFERENCIAS .....	62

## **ABREVIATURAS**

BAL: Bacterias Ácido Lácticas.

LEV: Levadura.

UPA: Uva pasa y algarrobo.

BAC: Bacterias de ácido láctico.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes cárnicas de microorganismos involucrados en el proceso de ensilaje.	20
Tabla 2. Información Nutricional de diferentes productos comerciales a base de leche de soya.	32
Tabla 3. Datos del proceso de ensilado en el Ensayo 1.	37
Tabla 4. Datos del proceso de ensilado en el Ensayo 2.	40
Tabla 5. Criopreservación de bacterias ácido lácticas para la obtención de ensilaje microbiano a partir de fuentes naturales y alimenticias.	41
Tabla 6. Código y procedencia de Aislamientos Lácticos seleccionados en el presente estudio.	43
Tabla 7. Resultados pruebas API para los cuatro aislamientos de bacterias BAL y la Levadura.	45
Tabla 8. Resultados de la identificación molecular de las BAL seleccionadas para el consorcio microbiano	47
Tabla 9. Recuentos microbianos de microorganismos lácticos en los diferentes medios utilizados al cabo de 96 h de incubación a 23°C, en 4 lecturas realizadas, por medio y por aislamiento.	48
Tabla 10. Análisis bromatológico y microbiológico del ensilaje obtenido a partir de Uva Pasa y Algarrobo (Tratamiento Testigo)	50
Tabla 11. Análisis bromatológico y microbiológico del ensilaje obtenido a partir de Uva Pasa y Algarrobo UPA (Tratamiento con adición de inóculo BAL)	51
Tabla 12. Análisis bromatológico y microbiológico comparativo del ensilaje obtenido a partir de Uva Pasa y Algarrobo UPA (Testigo) vs Uva Pasa y Algarrobo UPA	52

(Tratamiento con adición de inóculo BAL)

Tabla 13. Análisis Bromatológico de Maíz previo al proceso de ensilaje 53

Tabla 14. Análisis Bromatológico y microbiológico del ensilaje obtenido a partir de maíz (Tratamiento adicionado con inóculo BAL) 53

Tabla 15. Análisis Bromatológico y Microbiológico Comparativo del ensilaje Silo Maíz Testigo\*\* vs Silo Maíz (Tratamiento con adición de inóculo BAL) 55

Tabla 16. Análisis Bromatológico Microbiológico comparativo de material fresco y ensilado a base de maíz 57

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evaluación de medios para la producción masiva del inóculo.	34
Figura 2. Formulación en gel de uno de los inóculos elaborados.	35
Figura 3. Disposición de tratamientos en el proceso de ensilaje a base de UPA realizado en la Industria Licorera de Caldas.	37
Figura 4. Disposición de tratamientos en el proceso de ensilaje a base de maíz, realizado en la Finca La Camelia, Municipio de Manizales	39
Figura 5. Observación microscópica de las BAL seleccionadas.	42
Figura 6. Aspecto de las galerías del medio API 50CHB/E para cada uno de los cuatro aislamientos evaluados.	44
Figura 7. Aspecto de las galerías del medio API Cándida, para la levadura evaluada	44

## 1 INTRODUCCIÓN

La actividad ganadera depende de dos recursos fundamentales a saber, el agua, como insumo estratégico que debe proveerse en forma permanente y oportuna para asegurar los consumos diarios de los bovinos y la disponibilidad de alimento adicional para épocas de sequía, sabiendo que las cantidades diarias necesarias de forraje dependen del peso del animal y de su orientación productiva (Quirós, 2009).

En la actualidad la ganadería enfrenta graves problemas de disponibilidad de forraje; el pasto ha sido durante mucho tiempo la base de la producción ganadera en las zonas tropicales, pero los efectos del cambio climático y el mal manejo de este han contribuido a su deterioro. Existe una opción económica en épocas de verano con el empleo de bloques multinutricionales a base de melaza, urea, minerales, fibra y aglutinantes; utilizados como suplemento alimenticio para el ganado y complementados con el pastoreo en áreas de rastrojo de cultivos brindando una opción de alimentación con la adecuada evaluación de su aporte nutricional para no afectar la condición corporal de los animales (Quirós, 2009). En este sentido, la utilización estratégica de cercas vivas en las zonas ganaderas ha cobrado un espacio importante; si los árboles son podados al final del período de lluvias, se estimula el rebrote de follaje durante el período de verano. De un kilómetro de cerca viva se puede obtener una tonelada de forraje seco, el cual puede ser ofrecido en el potrero, con el propósito de disminuir los costos de la suplementación (Quirós, 2009).

Existen métodos como la formulación de suplementos energético-proteicos y la utilización de subproductos como los desechos de piña y melón, que tienen un alto potencial de utilización en varias zonas ganaderas. Como alimento para ganado la caña de azúcar tiene un gran valor por su alto contenido de azúcar que proporciona gran parte de la energía que los animales necesitan y representa beneficios económicos para el productor en términos de la relación costo-beneficio (Quirós, 2009).

La importación de maíz y otros cereales es muy frecuente en Colombia para la elaboración de concentrados animales para ganado bovino, lo que refleja un aumento en los costos de la alimentación de los animales. En este sentido, el ensilaje de maíz se ha convertido en una

alternativa económica para los criaderos de ganado puro aportando mayor volumen corporal y buena fuente de carbohidratos Adagrocolombia, 2015(Adagrocolombia, 2015).

El ensilaje es un proceso empleado en países desarrollados como Holanda, Alemania y Dinamarca (Adagrocolombia, 2015); en Colombia se emplean técnicas artesanales que se pueden mejorar para obtener productos con alta calidad nutricional y con mayor rendimiento productivo. Existe desconocimiento de los productores acerca de la forma de obtención de ensilaje y en general, ésta no obedece a un proceso planificado que garantice rentabilidad. En muchas ocasiones no se tiene control del proceso de ensilaje de modo que no se garantiza su calidad, y es en esta condición, donde los inóculos bacterianos y otros aditivos incorporados contribuyen a la optimización del proceso de fermentación dirigido a la obtención de ensilaje (*Stefanie et al., 1999*).

En la actualidad, existe poca información acerca de productos comerciales de tipo microbiano dirigidos a la obtención de ensilaje, frente a una demanda evidente del sector ganadero, con el fin de enfrentar problemas inherentes a la disponibilidad de alimento para el ganado en épocas de sequía. Consecuentemente, el presente estudio busca desarrollar un inóculo microbiano que permita controlar el proceso de obtención de ensilaje a través de la intervención de los microorganismos lácticos, para garantizar la calidad fisicoquímica y nutricional del alimento obtenido.

En el contexto del área de conocimiento de la microbiología agroindustrial, la intervención del profesional permite el desarrollo de soluciones biotecnológicas dirigidas al control del proceso de ensilaje, que se ha realizado en forma empírica en el país. De esta manera, el microbiólogo agroindustrial desde su perfil de conocimiento puede realizar aportes en la toma correcta de decisiones, para el desarrollo de una oferta de gran valor nutricional para el ganado que contribuya con el mejoramiento de la economía local y regional.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Seleccionar bacterias ácido lácticas y levaduras a partir de fuentes naturales y alimenticias para el desarrollo de un inóculo aplicable a la obtención de ensilaje.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Aislar y seleccionar bacterias ácido lácticas y levaduras para la obtención de ensilaje microbiano, a partir de fuentes naturales y alimenticias.
2. Caracterizar las bacterias seleccionadas mediante métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares.
3. Desarrollar consorcios microbianos a partir de las bacterias seleccionadas para la obtención de ensilaje mediante fermentación en fase sólida.
4. Realizar la caracterización bromatológica y microbiológica del ensilaje obtenido.

### 3 REFERENTE TEÓRICO

#### 3.1 Antecedentes

La práctica del ensilaje a nivel mundial es muy común en la actualidad, se estima que en el mundo se ensilan anualmente 200 millones de toneladas de materia a un de costo entre US \$100 – 150 por tonelada, que involucra la tierra y el cultivo, (aproximadamente 50%), el corte y el plástico (30%), el silo (13%) y los aditivos (7%) (Adagrocolombia, 2015).

Países como Holanda, Alemania y Dinamarca almacenan más del 90 % de sus forrajes como ensilaje. Las cosechas más importantes para el ensilaje en el mundo son las de maíz, alfalfa y pastos, aunque también se ensilan trigo, sorgo y algunas leguminosas. En Argentina y Brasil, el ensilaje de maíz es el gran soporte de la base nutricional bovina (Prácticas para un buen ensilaje, 2012)

El ensilaje es un modo de alimentación económica que puede complementar los requerimientos nutricionales del animal. El ensilaje de maíz es uno de los forrajes conservados más importantes y versátiles en el mundo, consiste en una mezcla única de grano y fibra que constituye una fuente energética para la alimentación de rumiantes, incrementando el volumen corporal sin acumulación de grasa y con aumento de peso mensual (Adagrocolombia, 2015).

El procedimiento del ensilaje se lleva a cabo desde hace mucho tiempo de manera empírica, mediante el picado del pasto y el maíz, su depósito en canecas con apisonado manual, o en montón, dispuestos en pilas de material y con el empleo de aditivos como la melaza, la urea, y las pulpas de cítricos, entre otros materiales que aceleran el proceso de ensilaje en un empaque hermético durante un tiempo definido por cada agricultor, que puede variar desde los 21 días, 45, 60, y hasta 90 o más, en función del tiempo requerido para la alimentación animal (Video: Tierra, pastos y ganado 2009).

Un área considerable del país está conformada por zonas ganaderas caracterizadas por largos periodos de lluvias y largos periodos de sequedad, en los cuales escasea la producción de alimento animal; el proceso de ensilaje sirve para almacenar alimento en tiempos de cosecha y suministrarlo en tiempos de escasez, conservando calidad y palatabilidad a bajo costo,

permitiendo aumentar el número de animales por hectárea, o la sustitución o complementación de los concentrados (Adagrocolombia, 2015).

Por las razones mencionadas, el presente busca desarrollar un inóculo para ensilaje a partir de microorganismos ácido lácticos nativos, aislados de fuentes naturales y alimenticias, técnicamente seleccionados para el desarrollo de un consorcio microbiano, con el fin de contribuir a la amplia oferta de aplicaciones biotecnológicas de tipo microbiano para la obtención de forraje de buena calidad a bajo costo, en todas las zonas ganaderas del país.

## **3.2 Marco teórico**

### **3.2.1 El ensilado**

El ensilaje es un método de conservación de forrajes en el que se inhibe el crecimiento de microorganismos degradadores de la materia orgánica mediante la preservación con ácidos, adicionados o generados por fermentación natural; se realiza en un recipiente denominado silo en el que se dispone el material en capas uniformes que se van apilando para desplazar el oxígeno y finalmente se cubre herméticamente (Mier, 2009).

### **3.2.2 Acción de los microorganismos**

Existe gran diversidad de microorganismos que se desarrollan en el ensilaje, algunos son benéficos, acidifican la masa del forraje reduciendo el pH y se desarrollan en ausencia de aire (anaerobiosis). Otros son perjudiciales, crecen y se multiplican en presencia de oxígeno y compiten con los microorganismos lácticos a través de la asimilación de azúcares. Así mismo, pueden presentarse otros microorganismos anaerobios que hidrolizan las proteínas liberando olores desagradables (Mier, 2009).

En una primera fase se registra el desarrollo de bacterias como *Klebsiella* y *Acetobacter*, que son más activas en condiciones de aire aprisionado en el forraje. Estas bacterias emplean como sustrato carbohidratos que se transforman en CO<sub>2</sub> y ácido acético de baja capacidad acidificante. Al cabo de 24 a 48 horas, aparecen bacterias de los géneros *Leuconostoc* y *Streptococcus*, que transforman los azúcares en ácido láctico que ayuda a bajar el pH

rápidamente. A medida que las concentraciones de ácido láctico se incrementan disminuyen estos géneros y aparecen los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, grandes formadores de ácido láctico, entre el tercero y quinto día. Desde aquí hasta el día 17 a 21 de la conservación, el ácido se va acumulando en cantidades crecientes al tiempo que el forraje se hace cada vez más inhabitable para otras bacterias. Si durante este período se ha producido suficiente cantidad de ácidos como para llevar el pH a un valor de 4,2 o inferior, el forraje se conservará por un período indefinido con un valor nutritivo semejante al que poseía al disponerse en el silo (Ellis et al., 2016).

En las ganaderías modernas los forrajes son cortados en la fase de mayor rendimiento y valor nutritivo, para el ensilaje y suministro continuo de alimento durante el año. La calidad final del ensilado depende tanto de las materias primas como de la aplicación adecuada de la técnica. En la materia prima es importante considerar la altura de corte, la humedad, el tamaño de partículas, la porosidad de la masa forrajera, la resistencia a la compactación y la calidad fermentativa, determinada por la concentración de ácidos orgánicos, nitrógeno amoniacal y pH (Jobim, 2007) Mier, 2009). En general, los forrajes con una concentración alrededor de 6-8% de carbohidratos solubles y un contenido de materia seca alrededor de 32-35%, con bajo poder tampón, constituyen una adecuada materia prima para el ensilaje (Vieira da Cunha, 2009).

El ensilaje se logra por medio de una fermentación láctica espontánea en condiciones anaerobias. Las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAC) fermentan los carbohidratos hidrosolubles del forraje, produciendo ácido láctico y ácido acético en menor cantidad. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado se reduce inhibiendo la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción. (Garcés, 2004).

El proceso del ensilaje se puede dividir en cuatro etapas:

### **3.2.3 Fase 1: Fase Aeróbica**

Esta fase dura pocas horas, el oxígeno atmosférico presente en la masa disminuye rápidamente debido a la respiración de los microorganismos aerobios y aerobios facultativos, como las levaduras y enterobacterias. Además, hay actividad de enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas, en un pH propio del jugo del forraje fresco (pH 6,5-6,0). Las levaduras

son microorganismos anaerobios facultativos y heterótrofos, cuya presencia en el ensilaje es indeseable fermentan azúcares en condiciones anaerobias produciendo etanol y CO<sub>2</sub> (Garcés, 2004).

La producción de etanol reduce el azúcar disponible para producir ácido láctico, y produce un mal gusto en la leche como alimento para vacas lecheras. Además, en condiciones aerobias, muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, elevando el pH del ensilaje y permitiendo el crecimiento de otros organismos no deseables. Las enterobacterias son organismos anaerobios facultativos, la mayoría de las que se encuentran en el ensilaje no son patógenas. Su desarrollo en el ensilaje es perjudicial porque compiten con las BAC por los azúcares disponibles y degradan las proteínas. La degradación proteica causa una reducción del valor nutritivo del ensilaje y genera compuestos tóxicos como aminos biogénicas y ácidos grasos de cadena múltiple (Garcés, 2004).

### **3.2.4 Fase 2: Fase de Fermentación**

Esta fase se presenta en condiciones anaerobias, con una duración de días a semanas, en función de las características del material ensilado y las condiciones ambientales. Si la fermentación se desarrolla con éxito se incrementarán las poblaciones BAC y por ende su actividad, y debido a la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH bajará a 3,8 a 5,0. Las BAC pertenecen a la microflora epifítica de los vegetales. Las BAC que se asocian con el proceso de ensilaje pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (Garcés, 2004).

La mayoría de estos géneros son mesófilos, crecen en un rango de temperaturas entre 5° y 50 °C, con un óptimo de 25° a 40°C. Son capaces de bajar el pH del ensilaje a valores entre 4 y 5, dependiendo de las especies y del tipo de forraje. Todos los miembros BAC son aeróbicos facultativos, pero muestran cierta preferencia por la condición anaerobia. Las características del cultivo como contenido de azúcares, contenido de materia seca y composición de los azúcares, sumado a las propiedades del grupo BAC, así como su tolerancia a condiciones ácidas o de presión osmótica y el uso del substrato, influirán sobre la capacidad de competencia de la microbiota BAC con las enterobacterias durante el proceso de fermentación (Garcés, 2004).

### **3.2.5 Fase 3: Fase Estable**

La mayoría de los microorganismos de la fase 2 van desapareciendo, pero algunos microorganismos acidófilos sobreviven en estado inactivo; otros, como clostridios y bacilos, sobreviven como esporas. Sólo algunas proteasas y carbohidrasas y microorganismos especializados, como *Lactobacillus buchneri* que toleran ambientes ácidos, continúan activos a menor ritmo. Si el ambiente se mantiene sin aire ocurren pocos cambios. Algunas bacterias indeseables en la fase 3 son las bacterias acidófilas, ácido tolerantes y aerobias. Por ejemplo *Acetobacter* spp., es perniciosa en el ensilaje porque puede iniciar una deterioración aeróbica, oxidando el lactato y el acetato y produciendo CO<sub>2</sub> y agua. El género *Clostridium* es anaerobio, forma endosporas y puede fermentar carbohidratos y proteínas, disminuyendo el valor nutritivo del ensilaje y originando malos olores. La presencia de *Clostridium* en el ensilaje altera la calidad de la leche, sus esporas sobreviven después de transitar por el tracto digestivo y se encuentran en las heces. El género *Bacillus* spp., corresponde a bacterias aerobias facultativas esporuladas, fermentan un amplio rango de carbohidratos, produciendo ácidos orgánicos (p. ej.: acetatos, lactatos y butiratos) o etanol, 2,3-butanodiol o glicerol. Algunas especies de *Bacillus* producen sustancias fungicidas y se han utilizado para inhibir el proceso de deterioro aeróbico en ensilajes, con excepción de estas especies, el desarrollo de los bacilos en el ensilaje no es deseable por su baja producción de ácido láctico y acético, comparado con el grupo BAC, y por el deterioro aerobio que pueden causar en el material (Garcés, 2004)

### **3.2.6 Fase 4: Fase de Deterioro Aerobio**

Ocurre en todos los ensilajes al ser expuestos al aire para su empleo, pero puede ocurrir antes por daño de la cobertura del silo (p. ej. roedores o pájaros). El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. Esto aumenta el valor del pH y promueve el inicio de la segunda etapa de deterioro; en ésta, aumenta la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, correspondientes al género *Bacillus*. La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aerobios facultativos, como mohos y enterobacterias. Los

mohos son organismos aerobios cuya presencia en el ensilaje se detecta por la aparición de filamentos de diversos colores, se desarrollan en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno. Esto ocurre sólo al inicio del almacenamiento, en un buen ensilaje, y se restringe a la capa exterior de la masa, pero durante la fase del deterioro aerobio, todo el ensilaje puede ser invadido por moho, disminuyendo el valor nutritivo, la palatabilidad y generando riesgo para la salud humana y animal (Garcés, 2004).

Según Roth y Heindrichs, 2010, el uso del maíz para el ensilaje genera una cosecha con altos rendimientos, alto contenido de energía a bajo costo, para alimentación de ganado de ceba. Este ensilaje requiere menos trabajo para producir una tonelada de forraje que muchos otros cultivos forrajeros, se puede prolongar el período de cosecha y provee una oportunidad para obtener valor agregado de cosechas deterioradas. Este ensilaje también puede reciclar los nutrientes de las plantas eficientemente, especialmente grandes cantidades de N y K (Garcés, 2004).

En la Tabla 1., se relacionan algunas fuentes de origen de los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación realizado en la producción de silo.

**Tabla 1.** Fuentes cárnicas de microorganismos involucrados en el proceso de ensilaje.

<b>CARNE</b>	<b>MICROORGANISMO</b>
<b>Embutidos</b>	
Salami	<i>Lactobacillus</i> homofermentativos
Salchichón ahumado	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> heterofermentativos
Salchichas Frankfurt	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
De cerdo fresco	<i>Pediococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
<b>Panceta</b>	
Envasada como fetas	Principalmente <i>Lactobacillus</i> spp., también Enterococos.
Tipo Wiltshire	<i>Lactobacillus</i> spp.
Empaquetado al vacío	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
<b>Jamón</b>	
Crudo	<i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., Enterococos.
Envasado como fetas	<i>Streptococcus faecium</i> .
Prensado, con especias	<i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactobacillus</i> heterofermentativos
Enlatado	Enterococos.

Fuente: Cabeza 2006.

El valor nutritivo del ensilado de maíz puede ser mejorado con inoculantes bacterianos los cuales contienen bacterias productoras de ácido láctico que se agregan a la población bacteriana natural para ayudar a garantizar una fermentación rápida y eficiente en el silo (Mier, 2009). Según Argamentería *et al.*, (1997), la función de las bacterias productoras de ácido láctico es elevar el nivel de acidez del forraje a ensilar, para prevenir la ruptura de la proteína. Así mismo, el uso de inoculantes microbianos puede mejorar la calidad fermentativa del ensilaje, por la reducción de ácido acético y nitrógeno amoniacal (Mier, 2009).

El uso de inoculantes bacterianos como bacterias del ácido láctico de los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* para ensilaje, no sólo tiene efecto sobre el proceso de fermentación, sino que también incrementa la producción animal en términos de la cantidad y/o composición de la leche, condición corporal del animal, ganancia de peso vivo y parámetros reproductivos (Mier, 2009).

### **3.2.7 Procesos químicos y biológicos del ensilaje**

El forraje que se ensila sufre transformaciones a causa de la acción de las enzimas de la planta y de los microorganismos presentes en la superficie foliar, o microorganismos que puedan incorporarse voluntariamente (aditivos), ó accidentalmente (contaminación con suelo). Las enzimas actúan sobre procesos respiratorios y descomponen glúcidos y proteínas (Cañete y Sancha, 1998).

### **3.2.8 Inóculos**

El papel primordial de los inóculos microbianos es incrementar la acidez del forraje a ensilar para prevenir la ruptura de proteína, a través del aporte de microbiota láctica no presente en cantidad suficiente en el forraje en forma natural (de la Roza, 2005).

Estudios realizados en condiciones de laboratorio y campo han permitido recomendar el uso de inoculantes bacterianos para todo tipo de ensilados, en función de la eficiencia del proceso fermentativo, recuperación de materia seca (MS), conversión alimentaria y aumento de peso

animal por tonelada de ensilaje (Mier, 2009).

Otras investigaciones han mostrado que en ensilado de soya tratado con inóculos bacterianos y melaza incorporada, se redujo el pH en los tratamientos evaluados, con y sin deshidratación parcial, y además, se observó que la melaza incrementó el contenido de materia seca (Cañete y Sancha, 1998).

### **3.2.9 Factores que influyen en la conservación**

Los forrajes conservados pueden tener un valor alimenticio alterado debido a manipulaciones, procesos y fenómenos bioquímicos y microbiológicos implicados en su conservación, de modo que la calidad del ensilaje depende de la fermentación y de las pérdidas de compuestos solubles (Jobim *et al.*, 2007)

El contenido de materia seca es fundamental en la determinación de un correcto proceso de conservación, un bajo nivel de materia seca presenta problemas por pérdida de jugos; la deformación que se produce en las pacas podría comprometer su hermeticidad, la heterogeneidad entre pacas perjudica la conservación (Cañete y Sancha, 1998), los ensilados pueden adquirir un color pardo oscuro, y aunque no sean totalmente rechazados por los animales, tienen bajo valor nutritivo por lo que se debe procurar una humedad homogénea en cada paca y entre éstas (de la Roza, 2005).

### **3.2.10 Indicadores de Calidad Fermentativa**

La calidad de un ensilado depende de su valor nutritivo, que está ligado directamente a su composición química (fibra, materias nitrogenadas, minerales, hidratos de carbono) y de la calidad de conservación, que viene definida por los productos finales de las fermentaciones que tienen lugar en el mismo (Cañete y Sancha, 1998).

De igual manera, la calidad puede ser evaluada visualmente en unión con el análisis químico; factores como el olor, color o apariencia general pueden suministrar una indicación del valor nutritivo esperado; el aspecto y la composición química antes de ensilar permiten una predicción de la calidad futura del ensilado (Cañete y Sancha, 1998).

El valor nutritivo, dado por el contenido de principios nutritivos y su digestibilidad, debe complementarse con una fermentación correcta que asegure que el ensilado va a ser estable. Estos parámetros fermentativos como nitrógeno amoniacal, nitrógeno soluble total, azúcares residuales, alcoholes, ácidos grasos volátiles y ácido láctico, aportan información sobre el proceso fermentativo ocurrido (Mier, 2009).

El nitrógeno soluble y nitrógeno amoniacal se presenta como una medida de degradación de la proteína que tuvo lugar durante el proceso de ensilado; la escasez de azúcares solubles residuales en el jugo, es un indicador de una correcta fermentación láctica, y el ácido láctico, es una medida de la transformación de los azúcares presentes en el forraje, para contribuir a la reducción de pH y estabilidad del ensilaje (de la Roza, 2005).

### **3.2.11 Indicadores de Calidad Nutritiva**

El valor energético, nitrogenado y la digestibilidad de los ensilados determina la calidad del forraje al momento de su recolección y sus ateraciones, ligadas a las técnicas de recolección, manejo y conservación. Los resultados pueden ser negativos si el proceso no se realiza en forma adecuada (de la Roza, 2005).

Las determinaciones analíticas mínimas necesarias para poder valorar un ensilado, desde el punto de vista nutricional son: pH y contenido de principios nutritivos (materia seca, cenizas, proteína bruta, fibra neutro detergente y digestibilidad con celulasa) (Argamentería *et al.*, 1997).

Jobim *et al.*, 2007 afirma que el pH sirve como indicador de la calidad fermentativa de ensilados con bajo contenido de materia seca. Así mismo, el indicador más adecuado para determinar la calidad de fermentación de ensilajes, sería el contenido de ácidos orgánicos asociados (Mier, 2009).

El pH del jugo es un parámetro rápido e indicativo del tipo de fermentación que se presentó e indica si se dispone de un alimento estable. La materia seca es importante porque los demás componentes (excepto digestibilidad) están expresados sobre la base de materia seca. La conservación del ensilado indica la cantidad de principios nutritivos incorporados (Mier, 2009)

Mier, 2009 confirma que la proteína bruta es un parámetro relevante debido a su influencia directa en la producción animal. Para ensilados de maíz planta entera, el contenido está comprendido entre 8 y 10 % sobre base de materia seca. Si los valores son superiores y no hubo adición de urea, puede significar un corte temprano con pérdida de potencial de producción y bajo contenido en almidón. La fibra neutro detergente es la fracción del forraje que corresponde a las paredes celulares y se asocia negativamente con la ingestión de materia seca. El porcentaje de fibra neutro detergente se incrementa con el estado de madurez de los forrajes. Las cenizas indican el contenido mineral, si el porcentaje es alto (mayor del 15% sobre materia seca) pudo haber contaminación con tierra (Argamentaría *et al.*, 1997).

El valor nutritivo de los ensilajes está determinado básicamente por la composición del forraje al momento de la cosecha y por las modificaciones químicas que toman lugar durante el proceso de ensilado. El valor nutritivo del ensilaje es siempre menor en relación al material de origen, siendo la magnitud de estos cambios dependiente de las medidas que se adopten para conducir el proceso de conservación técnicamente, en la forma más adecuada. El valor nutritivo se considera como una función del consumo voluntario, digestibilidad y eficiencia de utilización de los nutrientes digeridos (Mier, 2009).

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Ubicación**

La prueba piloto de este estudio se realizó en predios rurales del Municipio de Manizales y en la planta de diseño y desarrollo de la empresa Soluciones Microbianas del Trópico.

### **4.2 Medios de cultivo**

#### **4.2.1 Agar MRS**

Este agar fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias acidolácticas. (Murray, 1995)

La peptona y glucosa son fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. De otra parte, el monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio es un agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram Negativas (Manual de Prácticas de Microbiología, 2012)

#### **4.2.2 Caldo MRS**

Este caldo también fue ensayado por Man, Rogosa y Sharpe para el enriquecimiento, el cultivo y el aislamiento de especies de lactobacilos y otras especies ácido lácticas de todo tipo de materiales. Contiene polisorbato, acetato, magnesio, manganeso y una base de nutrientes que promueven el crecimiento de lactobacilos (Manual de Prácticas de Microbiología, 2012)

#### **4.2.3 Agar PDA**

Es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras; puede suplementarse con antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano. Posee una base altamente nutritiva que permite esporulación y producción de pigmentos de algunos dermatofitos. Se recomienda bajar el pH del medio a 3.5 más o menos 0.1 con ácido tartárico al 10%, para inhibir el crecimiento bacteriano. La infusión de papa promueve un crecimiento abundante de los

hongos y levaduras y el agar es adicionado como agente solidificante (Manual de Prácticas de Microbiología, 2012)

#### **4.2.4 Peptona**

Consta de una variedad de hidrolizados proteínicos derivados de caseína, carne y vegetales que ofrecen una fuente efectiva de nitrógeno y carbono. La peptona estimula y promueve el crecimiento bacteriano, se emplea como medio de cultivo, para fabricación de toxinas, vacunas y otros productos biológicos (Manual de Prácticas de Microbiología, 2012)

#### **4.2.5 Caldo Extracto de Malta**

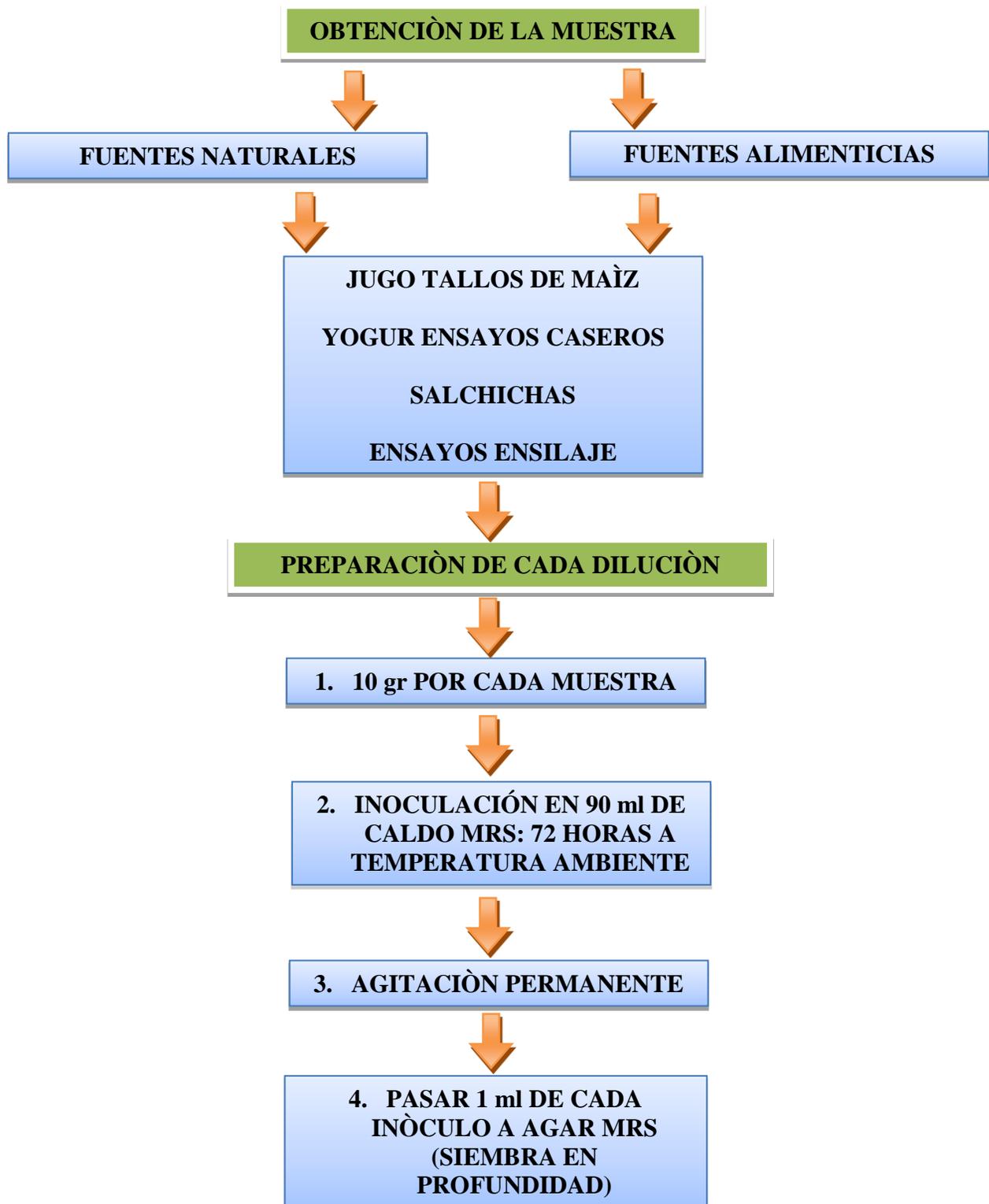
Empleado para el aislamiento y recuento de mohos y levaduras. El extracto de malta proporciona las fuentes de carbono, proteínas y nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos; tiene altas concentraciones de maltosa y otros sacáridos que son fuente de energía para los mohos y las levaduras; posee además, extracto de levadura como fuente de vitaminas (Manual de Practicas de Microbiología, 2012)

### **4.3 Procedimientos**

#### **4.3.1 Aislamiento, identificación y selección de microorganismos lácticos.**

Las bacterias lácticas se aislaron a partir de fuentes naturales y alimenticias, tales como jugos de tallos de maíz, yogurt (ensayos caseros) y salchichas Frankfurt (Cabeza, 2006) y ensayos de ensilaje en finca. Para el caso específico del yogurt casero y la salchichas, se realizó un licuado de la mezcla y se procedió a su aislamiento. El siguiente diagrama de flujo relaciona a el procedimiento empleado:

**Flujograma No. 1. Procedimiento para el aislamiento, identificación y selección de bacterias lácticas (BAL) a partir de fuentes naturales y alimenticias.**

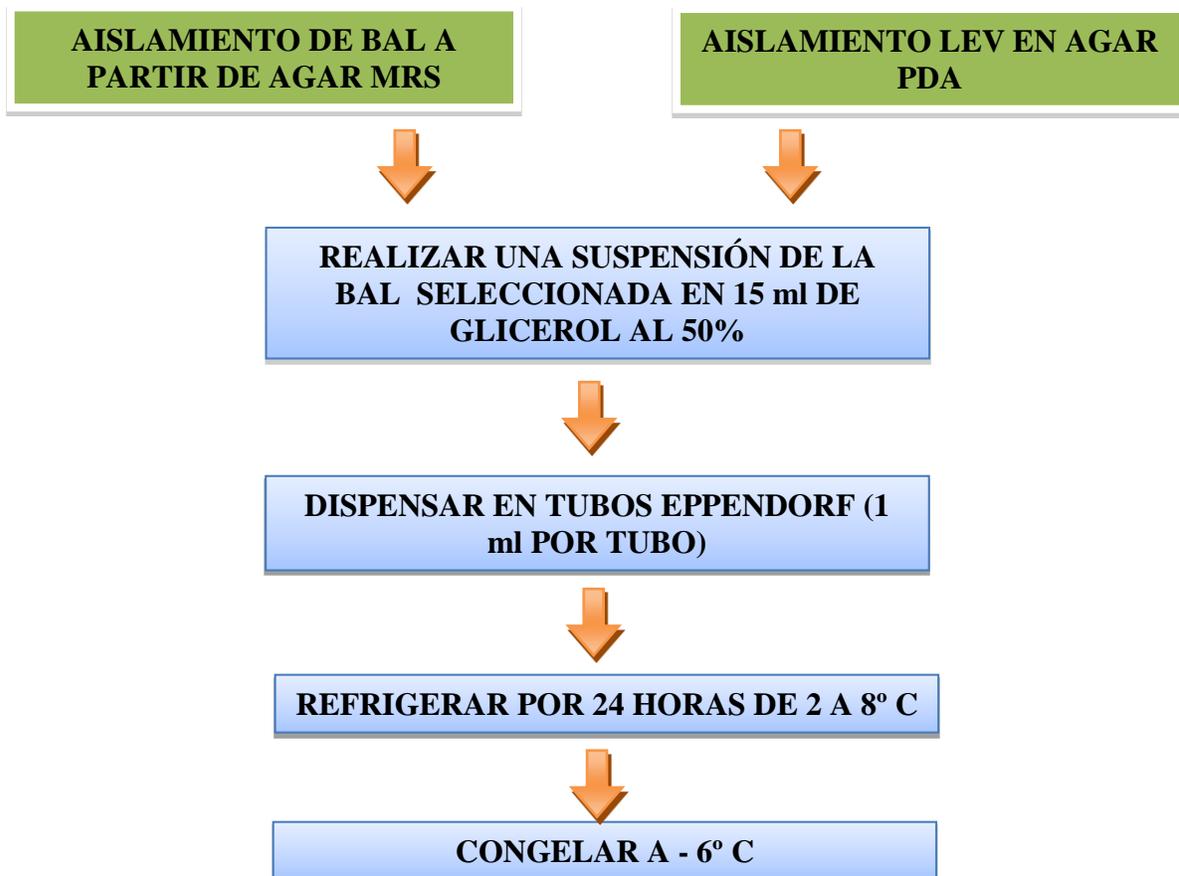


#### 4.3.2 Caracterización microscópica y criopreservación de aislamientos lácticos.

Se realizó la purificación y recuperación de estos microorganismos lácticos en medio MRS, se obtuvieron colonias puras identificadas microscópicamente por medio de la coloración de Gram.

Posteriormente, se prepararon suspensiones de bacterias lácticas, de concentración conocida y se llevó a cabo la preservación de las cepas puras de bacterias y levadura, ácido lácticas, en glicerol al 50%, bajo congelación a  $-6^{\circ}\text{C}$ , según el diagrama de flujo que se muestra a continuación:

#### Flujograma No.2. Procedimiento detallado para la preservación de BAL y LEV a través de la técnica de congelación en glicerol al 50%



### **4.3.3 Caracterización bioquímica.**

A partir del resultado morfológico se realizaron pruebas bioquímicas utilizando galerías API 50CHB/E y API Cándida, Biomerieux, para la identificación de bacterias lácticas y la levadura, respectivamente. Esta es una técnica que parte de la obtención de un cultivo puro y fresco de la cepa bacteriana que se desea analizar.

El sistema miniaturizado API (Índice Analítico de Perfil) es un método rápido que permite la identificación de microorganismos por medio de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Está compuesto por medios de cultivo deshidratados o sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar. (Román, 2012).

A continuación se relaciona el diagrama de flujo para la caracterización bioquímica de bacterias lácticas a partir del sistema API 50CHB/E y API Cándida, específico para *Bacillus*, otros microorganismos relacionados y levaduras:

#### **Flujograma No.3. Procedimiento empleado para la caracterización bioquímica de BAL a partir del sistema API 50 CHB/E y API Cándida**



#### **4.3.4 Identificación molecular.**

Los análisis moleculares de estos aislamientos se realizaron en la Corporación Corpogen (Investigación y Biotecnología) en Bogotá, a través de los siguientes procedimientos:

- Aislamiento y purificación del DNA.
- Amplificación por PCR de la región de 1465 pb del gen ribosomal 16S

- Purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación con los iniciadores 27F, 518F, 800R, y 1492R del gen ribosomal 16S.
- Limpieza manual de cada una de las secuencias de los fragmentos obtenidos.
- Ensamblaje de las secuencias y obtención de la secuencia problema.
- Análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada, mediante la comparación contra las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), Greengenes (Laurence Berkeley National Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project).
- Alineamiento y generación de un árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema.
- Clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

#### **4.3.5 Evaluación de medios de cultivo para la producción masiva de bacterias lácticas.**

La selección de los medios de cultivo para la producción masiva de bacterias lácticas se realizó con base en su crecimiento en los medios evaluados, economía y facilidad de consecución de los sustratos empleados, teniendo en cuenta su proyección a un proceso de producción industrial en la empresa SOLUCIONES MICROBIANAS DEL TRÓPICO. En consecuencia, se decidió utilizar un medio a base de soya, teniendo en cuenta que ofrece los requerimientos nutricionales de este género de bacterias.

Según un estudio realizado a nivel comercial se recopiló la información nutricional que se muestra en la Tabla 2, para diferentes leches de soya en polvo.

**Tabla 2.** Información nutricional de diferentes productos comerciales a base de leche de soya.

INFORMACION NUTRICIONAL												
ALIMENTO EN POLVO A BASE DE SOYA												
DISTRIBUIDOR	# 1		# 2		# 3		# 4		# 5		# 6	
		Valor diario		Valor diario								
GRASA TOTAL	4 g	6%	9 g	14%	7 g	11%	5 g	8%	5 g	8%	3 g	4%
GRASA SATURADA	0.5 g	3%	4 g	20%	4 g	20%	3 g	15%	3 g	15%	<1 g	1%
GRASA TRANS	0 g	0%	0 g	0%								
COLESTEROL	0 mg	0%	0 g	0%	0 g	0%						
SODIO	220 mg	9%	160 mg	7%	180 mg	3%	160 mg	7%	150 mg	7%	0 mg	0%
POTASIO	-----	-----	560 mg	16%	400 mg	11%	240 mg	7%	240 mg	7%	-----	-----
CARBOHIDRATOS	15 g	5%	14 g	5%	16 g	5%	21 g	7%	21 g	7%	18 g	6%
FIBRA	6 g	24%	<1 g	0%	4 g	16%	3 g	12%	3 g	12%	1 g	4%
AZUCAR	5 g	-----	8 g	-----	7 g	-----	14 g	-----	14 g	-----	4 g	2%
PROTEINA	10 g	20%	9 g	18%	8 g	16%	6 g	12%	6 g	12%	9 g	18%

Fuente: Martínez, 2014

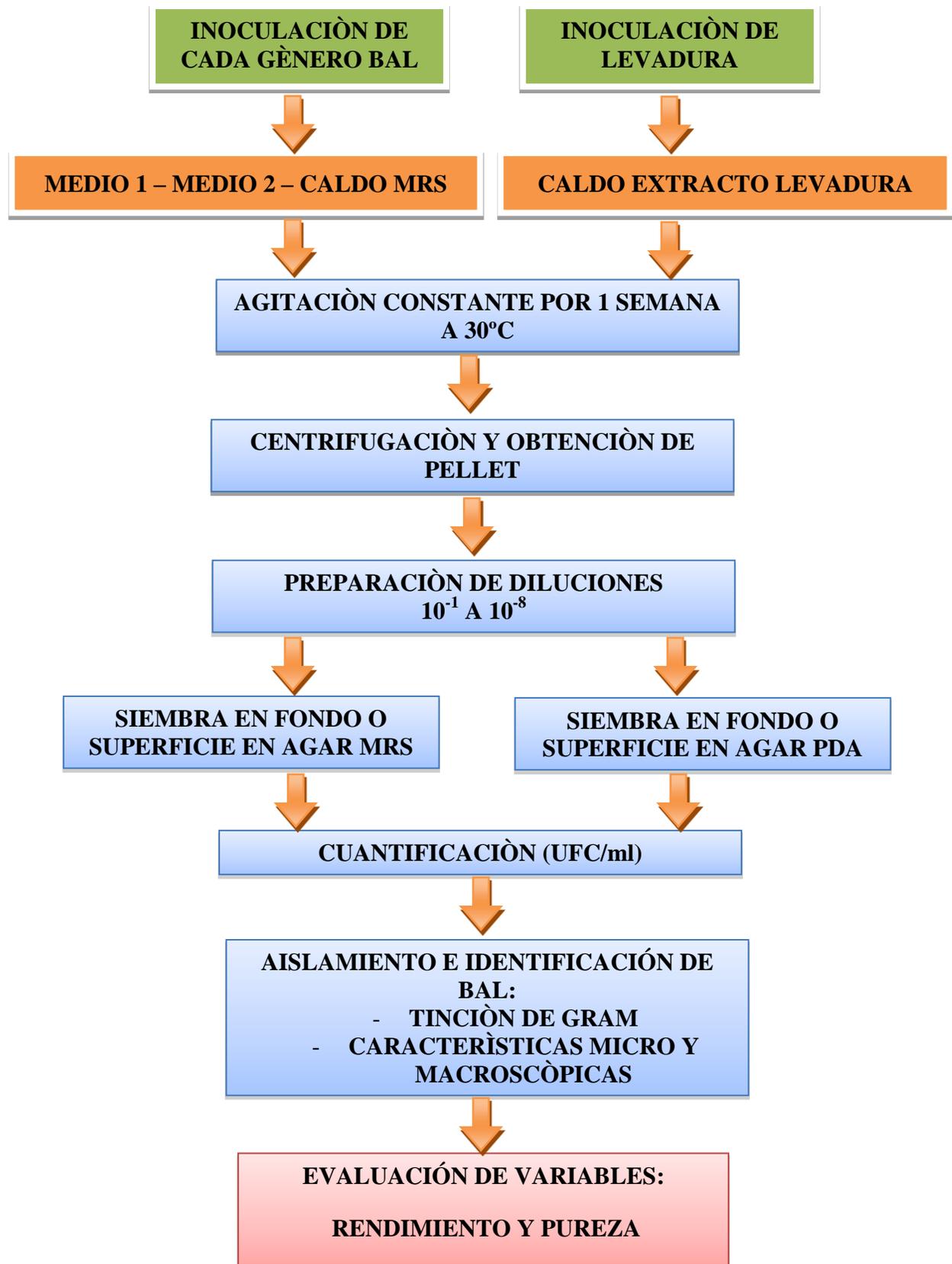
Como resultado del análisis de esta tabla y conforme a resultados de investigaciones previas realizadas en actividades de Práctica Formativa Bacteriología, 2014 (Martínez, 2014)), se seleccionó la leche de soya # 2 como base de los medios a evaluar en la producción masiva de estos aislamientos.

Para la producción masiva de bacterias lácticas se evaluaron dos medios de cultivo no comerciales (Medio 1 y Medio 2) y uno comercial (Medio 3, MRS) (Manual de Prácticas de Laboratorio, 2012) registrado como óptimo para el crecimiento de los géneros de las bacterias aisladas y seleccionadas en la etapa anterior, tal como se muestra en el flujograma No. 4.

Los medios de cultivo evaluados se relacionan a continuación:

- Medio 1. Leche de soya # 2, básico.
- Medio 2. Leche de soya # 2, suplementada con una fuente adicional de proteína.
- Medio 3. Medio nutritivo comercial, MRS.

**Flujograma No.4. Procedimiento para la inoculación y selección del medio de cultivo para la producción masiva de BAL y LEV.**



A continuación se ilustra la disposición de los medios de cultivo con los aislamientos evaluados:



**Figura 1.** Evaluación de medios para la producción masiva del inóculo. (Medios a base de soya, color beige, izquierda: Medio MRS, color marrón oscuro, derecha)

La producción masiva de la levadura aislada de fuente natural se realizó en los tres medios mencionados.

Las variables evaluadas en la producción masiva correspondieron a:

- **Rendimiento**, en términos de las UFC/ml obtenidas al cabo de un tiempo de cultivo dado (72 h, para la evaluación de bacterias lácticas y 96 horas, para la evaluación de la levadura).
- **Pureza**, referida a la caracterización morfológica, macro y microscópica del aislamiento.

#### **4.3.6 Formulación del consorcio microbiano para la obtención de ensilaje.**

Teniendo en cuenta el objetivo de la empresa Soluciones Microbianas del Trópico, en términos del desarrollo a futuro de este inóculo, se llevó a cabo un procedimiento de formulación en gel según metodología estandarizada en la empresa Soluciones Microbianas

del Trópico SAS, en la que se incorporó en forma individual uno de los géneros lácticos registrados (figura 2) y se realizó la evaluación respectiva en términos de pureza y viabilidad.



**Figura 2.** Formulación en gel de uno de los inóculos elaborados.

#### **4.3.7 Establecimiento de pruebas piloto de fermentación en fase sólida, a partir del consorcio microbiano seleccionado.**

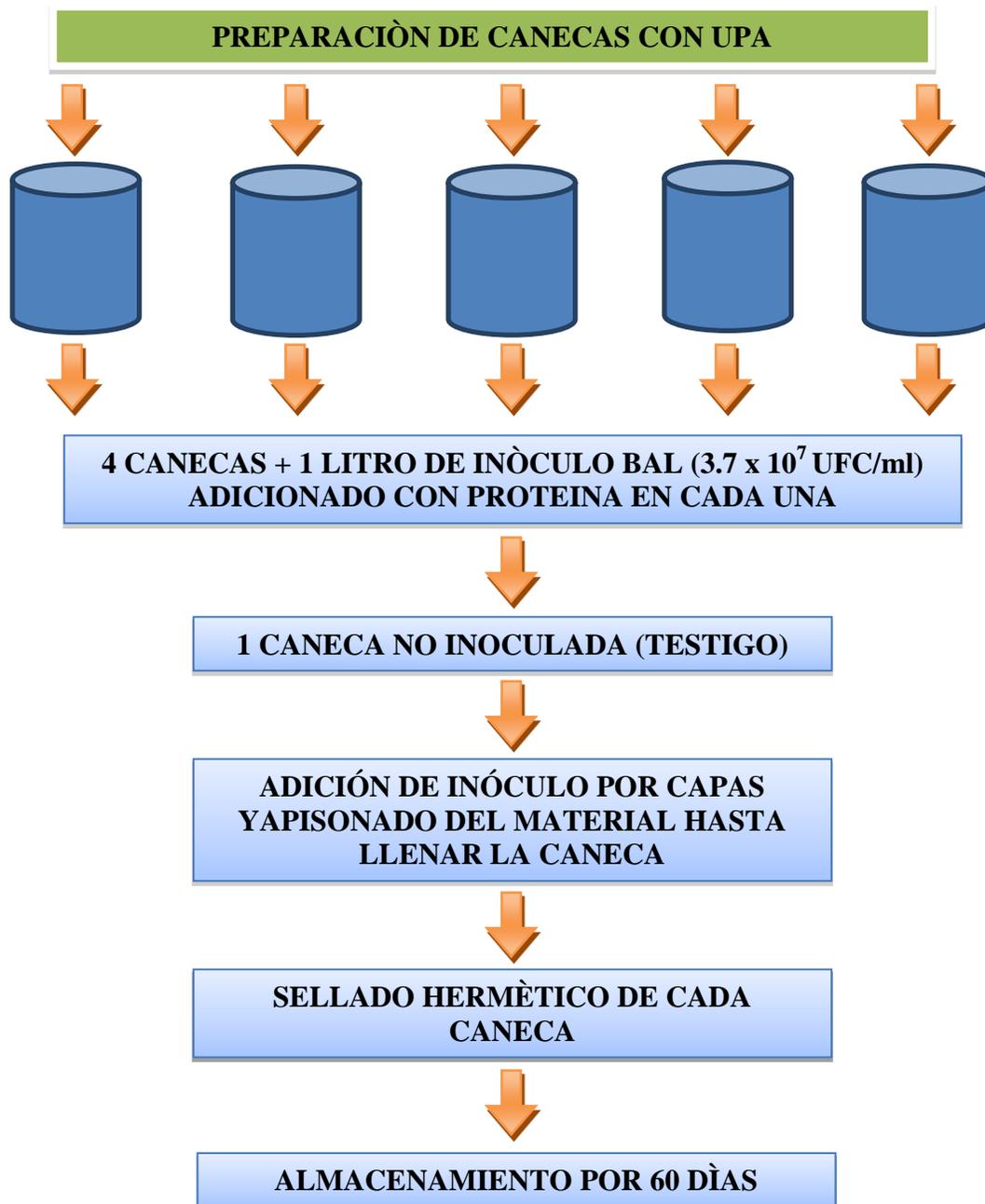
Para el propósito del presente estudio, tendiente a la evaluación preliminar de un inóculo seleccionado, se aplicó el consorcio microbiano, es decir, la mezcla de los géneros registrados y técnicamente seleccionados, en forma líquida, para las pruebas piloto realizadas en condiciones de campo. Para la selección técnica del consorcio se tuvo en cuenta la actividad homofermentativa y heterofermentativa de los géneros empleados, con el fin de garantizar la eficiencia del proceso de ensilaje.

El inóculo seleccionado incorporó una base nutritiva a base de soya para brindar estabilidad al consorcio y favorecer la actividad metabólica de los microorganismos lácticos presentes (microbiota nativa) en el material objeto de ensilaje.

Las dos pruebas piloto fueron realizadas a partir de dos materiales agrícolas diferentes, uva pasa algarrobo, proveniente de la Industria Licorera de Caldas, y maíz.

#### 4.3 8 Ensayo 1: Industria Licorera de Caldas.

Flujograma No.5. Procedimiento para la obtención de silo adicionado con BAL, LEV y fuente proteica, a partir de Uva pasa y algarrobo (UPA), proveniente de la Industria Licorera de Caldas



El ensayo se realizó el 4 de septiembre de 2015 en las instalaciones de la Industria Licorera de Caldas, Manizales. Se prepararon cinco canecas con uva pasa más algarrobo (UPA), el cual fue el material elegido para ensilar; a cuatro de ellas, se les adicionó 1L del inóculo BAL

seleccionado en una fuente proteica y la otra se tomó como testigo del ensilado natural. El proceso de adición de inóculo y llenado, se realizó por capas mediante apisonado, luego se sellaron herméticamente cada una de las canecas para ser almacenadas por un período de 60 días aproximadamente (Figura 3.). El día que se realizó el montaje, se tomaron muestras para el análisis fisicoquímico y microbiológico. En la Tabla 3, se indican las condiciones del inicio del proceso.



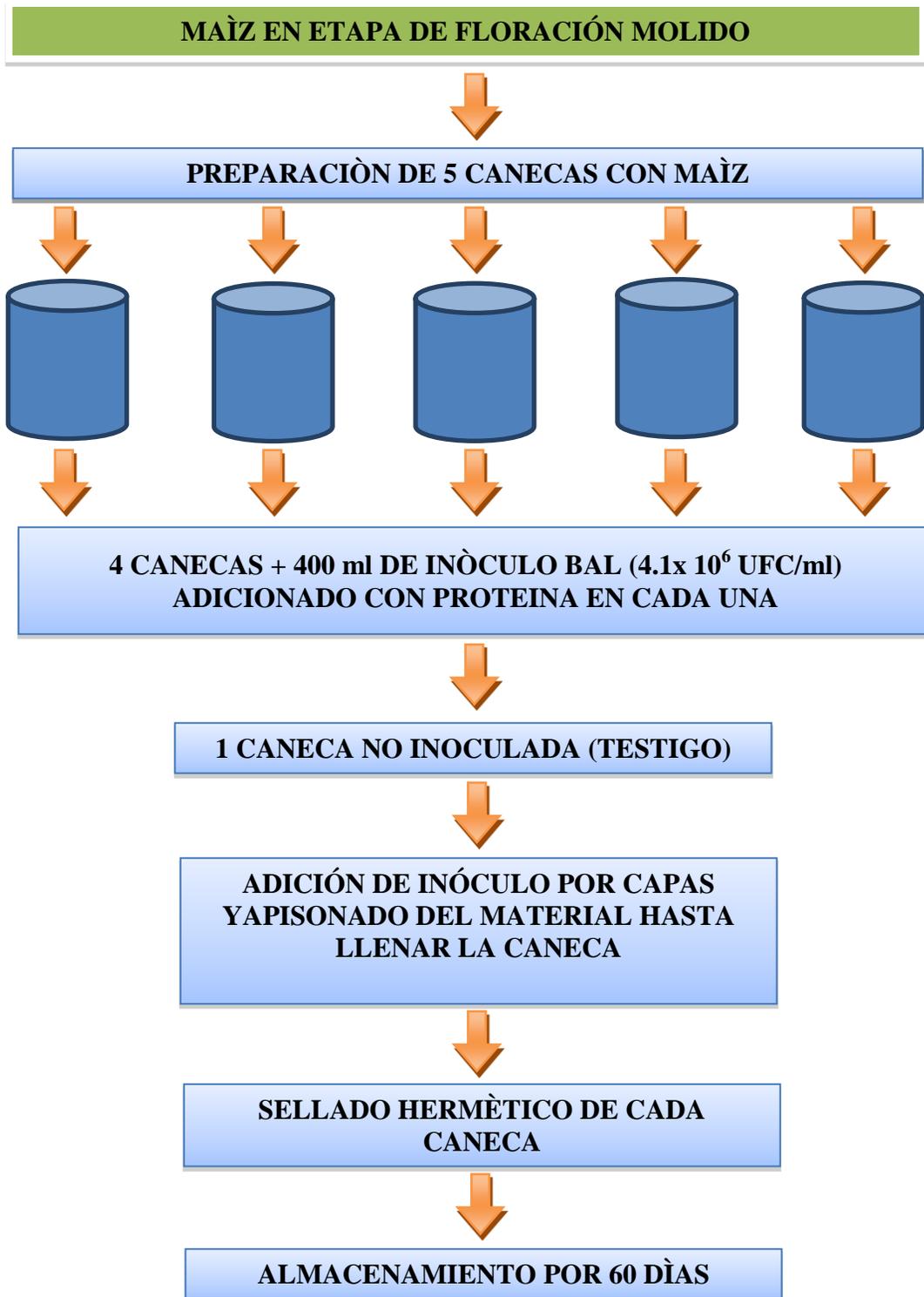
**Figura 3.** Disposición de tratamientos en el proceso de ensilaje a base de UPA realizado en la Industria Licorera de Caldas.

**Tabla 3.** Datos del proceso de ensilado en el Ensayo 1.

Peso caneca vacía	1,5 kg
Caneca + Sustrato (uva pasa y algarrobo)	45 kg
Inóculo	1L / caneca
Peso final de cada caneca	47 kg

#### 4.3.9 Ensayo 2: Finca la Camelia.

**Flujograma No.6. Procedimiento para la obtención de silo adicionado con BAL, LEV y fuente proteica a partir de Maíz**



El segundo ensayo se realizó el 8 de septiembre de 2015, con sustrato a base de maíz, obtenido a partir de un material genético híbrido adaptado a las condiciones de la zona cafetera para asociarse al cultivo de café, sembrado en un lote de la finca La Camelia ubicada en la vereda La Cabaña, Municipio de Manizales, a 1350 m.s.n.m., considerando una distancia de siembra de mínimo 1,20 m. entre surcos.

La colecta de la biomasa para el proceso de ensilaje se realizó en la etapa de floración, al cabo de 80 días de siembra aproximadamente.

Luego se trituró el maíz utilizando un molino de martillo. Este proceso arrojó pedazos o chips más finos que permitieron el crecimiento microbiano a través de la asimilación de los jugos propios del material, donde se presentó la mayor concentración de carbohidratos en la planta.

El material vegetal picado se empacó en cinco canecas plásticas diseñadas para tal fin. Se compactó el material extrayendo la mayor cantidad de oxígeno posible y a cuatro de ellas, se les adicionó el consorcio, la otra fue utilizada como testigo del ensilado natural. Al igual que en el Ensayo 1, el proceso de adición de inóculo BAL con fuente proteica y llenado, se realizó por capas mediante apisonado, luego se sellaron herméticamente y se almacenaron por un período de 60 días aproximadamente (Figura 4.).

El día que se realizó el montaje, se tomaron muestras para el análisis bromatológico y microbiológico. En la Tabla 4, se indican las condiciones del inicio del proceso.



**Figura 4.** Disposición de tratamientos en el proceso de ensilaje a base de maíz, realizado en la Finca La Camelia, Municipio de Manizales.

**Tabla 4.** Datos del proceso de ensilado en el Ensayo 2.

Peso caneca vacía	1,5 kg
Caneca + Sustrato (maíz molido)	20 kg
Inóculo	400 mL / caneca
Peso final de cada caneca	23 kg

El ensilaje obtenido en los ensayos 1 y 2, con sustrato a base de UPA y de maíz, fue evaluado en función de su calidad, con base en el análisis microbiológico, bromatológico y palatabilidad del material.

#### **4.4 Análisis de resultados**

Por tratarse de un estudio tendiente a la selección de bacterias ácido lácticas y levaduras a partir de fuentes naturales y alimenticias para el desarrollo de un inóculo aplicable a la obtención de ensilaje, los datos obtenidos en laboratorio tendientes a la evaluación de medios de cultivo para la producción masiva de bacterias lácticas fueron analizados bajo una prueba de t, en la variable recuento de ufc/ml. Se consideraron dos medios de cultivo y cuatro repeticiones por medio para cada una de las BAL evaluadas.

Los resultados de la etapa de campo fueron analizados en forma descriptiva, mediante la comparación de las características evaluadas en los tiempos 0 y final (tipo y concentración de bacterias lácticas, características fisicoquímicas del material obtenido), luego de 60 días de tratamiento con el consorcio seleccionado previamente, en función de los sustratos utilizados en cada uno de los ensayos realizados.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aislamiento, identificación y selección de bacterias lácticas.

#### 5.1.1 Caracterización microscópica y preservación de aislamientos.

En la Tabla No. 5, se describen los 15 géneros ácido lácticos aislados de las fuentes alimenticias (A) y naturales (N), su criopreservación y su identificación morfológica.

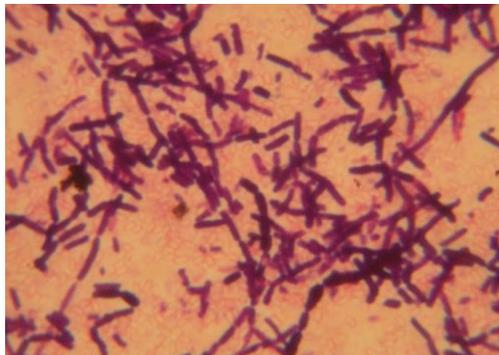
**Tabla 5.** Criopreservación de bacterias ácido lácticas para la obtención de ensilaje microbiano a partir de fuentes naturales y alimenticias

<b>CÓDIGO/PROCEDENCIA</b> <b>A</b>	<b>CRIOPRESERVACIÓN</b>		<b>IDENTIFICACIÓN</b> <b>N</b> <b>MICROSCÓPICA</b>
BAL 001/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 002/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 003/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 004/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 005/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 006/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 007/ A	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 008/ A	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 009/ A	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 010/ A	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 011/ A	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 012/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 013/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos
BAL 014/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram

			positivos
BAL 015/ N	Glicerol al 20%	Glicerol al 50%	Bacilos Gram positivos

Martínez, 2014; Giraldo, 2014)

A continuación se presenta la observación microscópica de la tinción realizada:



**Figura 5.** Observación microscópica de las BAL seleccionadas.

**Criterios de selección:** Del total de estos aislamientos registrados, se seleccionaron cuatro, teniendo en cuenta criterio de crecimiento en los medios nutritivos empleados y procedencia.

A continuación se relaciona su codificación y procedencia:

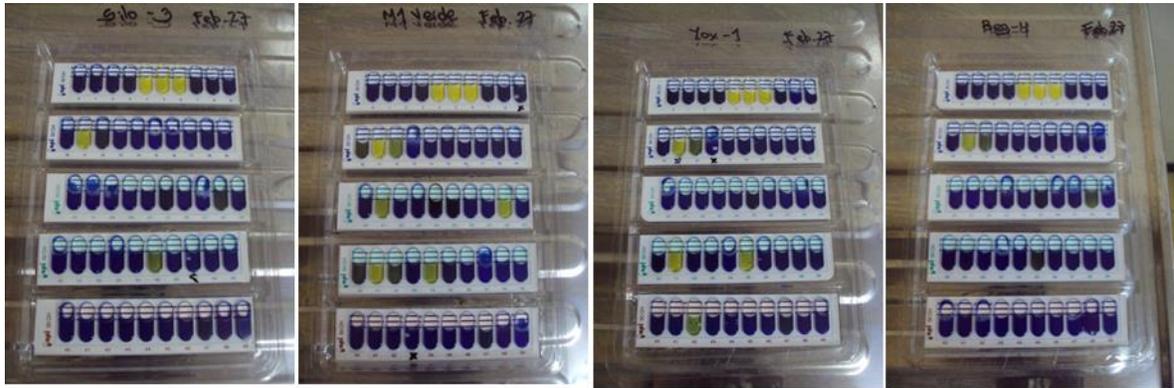
**Tabla 6.** Código y procedencia de Aislamientos Lácticos seleccionados en el presente estudio.

<b>CÓDIGO/ MORFOLOGÍA</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	
	<b>FUENTE NATURAL (N)</b>	<b>FUENTE ALIMENTICI A (A)</b>
<b>C12SMT/ (Bacteria Láctica, BAL)</b>	<b>N</b>	
<b>C13SMT/ (Bacteria Láctica, BAL)</b>	<b>N</b>	
<b>C14SMT/ (Bacteria Láctica, BAL)</b>		<b>A</b>
<b>C15SMT/ (Bacteria Láctica, BAL)</b>		<b>A</b>
<b>LEV01SM T/ Levadura</b>	<b>N</b>	

### **5.1.2 Pruebas bioquímicas**

La Figura No. 6, muestra el aspecto de las galerías del medio API 50CHB/E, para cada una de los aislamientos evaluados:

Para la identificación de *Lactobacillus* se observó fermentación de la glucosa principalmente a ácido láctico con aparición posible de trazas de otros productos; pueden existir D-Arabinosa y otros. Este estudio permitió realizar el estudio de fermentación de los 49 azúcares de la galería API 50 CHL. Estos son los carbohidratos:



**Figura 6.** Aspecto de las galerías del medio API 50CHB/E para cada uno de los cuatro aislamientos evaluados.

La Figura No. 7, muestra el aspecto de las galerías del medio API Cándida, para la levadura evaluada:



**Figura 7.** Aspecto de las galerías del medio API Cándida, para la levadura evaluada.

Las pruebas API realizadas para estos aislamientos seleccionados arrojaron los siguientes resultados:

**Tabla 7.** Resultados pruebas API para los cuatro aislamientos de bacterias BAL y la Levadura.

CÓDIGO BAL	RESPUESTA EN EL MEDIO API 50CHB/E	OBSERVACIÓN
C12SMT	No hubo un porcentaje de identidad definido	A pesar de esta respuesta y con base en criterios morfológicos y de crecimiento, se tomó la decisión de incluir este aislamiento para la caracterización molecular
C13SMT	<p><i>Lactobacillus buchneri</i>, 91,9 % de identidad como taxón significativo.</p> <p>En segundo lugar, apareció <i>Lactobacillus brevis</i>, con 7,8%</p> <p>En tercer lugar, <i>Lactobacillus fermentum</i>, con 0,1%</p>	La prueba permitió confirmación de género de este aislamiento
C14SMT	No hubo un porcentaje de identidad definido	A pesar de esta respuesta y con base en criterios morfológicos y de crecimiento, se tomó la decisión de incluir este aislamiento para la caracterización molecular

<p><b>C15SMT</b></p>	<p><i>Lactobacillus buchneri</i>, 51,1 % de identidad como taxón significativo.</p> <p>En segundo lugar, apareció <i>Lactobacillus fermentum</i>, con 25,8%</p> <p>En tercer lugar, <i>Lactobacillus brevis</i>, con 20,8 %</p> <p>En último lugar, <i>Lactobacillus fermentum</i>, con 1,3 %</p>	<p>La prueba permitió confirmación de género de este aislamiento</p>
<p><b>LEV01SMT</b></p>	<p><b>RESPUESTA EN EL MEDIO API 20 C AUX LEVADURA</b></p> <p><i>Cándida inconspicua</i></p> <p><b>o</b></p> <p><i>Cándida norvegensis</i></p>	<p><b>OBSERVACIÓN</b></p> <p>Este resultado debe ser complementado con la identificación molecular. Las regiones propuestas son: ITS y LSU, ambas de ARN ribosomal, con diferentes tasas de mutación, lo que permite diferente resolución en cuanto a género y especie.</p>

Los resultados permiten concluir que dos de los cuatro aislamientos seleccionados pertenecen al género *Lactobacillus* y la especie, *buchneri*, mientras que los otros dos, no permitían una confirmación definida, a pesar de mostrar características de morfología y tinción, propias de bacterias lácticas.

### 5.1.3 Identificación molecular

La Tabla 8 relaciona el resultado de la caracterización molecular de los cuatro géneros seleccionados realizado por Corpogen.

**Tabla 8.** Resultados de la identificación molecular de las bacterias lácticas seleccionadas para el consorcio microbiano.

Clasificación de las secuencias problema. Los valores de % de identidad y cubrimiento son calculados con respecto al mejor "hit" encontrado en las bases de datos					
MUESTRA		C12	C13	C14	C15
Longitud de la secuencia ensamblada		1488 pb	1489 pb	1444 pb	1487 pb
Resultados RefSeq Genomic NCBI	Microorganismo	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
	% de identidad	100	100	100	100
	% de cobertura	100	100	100	100
Resultados Seqmatch-RDP		<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
Resultados Greengenes		<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
CONCLUSIÓN	Género	<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Lactobacillus</i></b>	<b><i>Lactobacillus</i></b>
	Especie	<b><i>hilgardii</i></b>	<b><i>hilgardii</i></b>	<b><i>hilgardii</i></b>	<b><i>hilgardii</i></b>

Los resultados obtenidos permiten registrar la especie *hilgardii*, correspondiente al género *Lactobacillus*, en la caracterización molecular realizada, sin embargo, la caracterización bioquímica arrojó diferencias fisiológicas entre estos géneros, a juzgar por los resultados arrojados en la prueba API 50CHB/E, que permiten su selección con propósitos de desarrollo de un consorcio microbiano, aplicable a la obtención de silo para alimentación animal.

#### 5.1.4 Evaluación de medios de cultivo para la producción masiva de bacterias lácticas.

Con base en la respuesta de crecimiento de los microorganismos lácticos evaluados en los tres medios, y teniendo en cuenta el criterio de crecimiento, costo de la producción masiva y pureza, adoptado por la empresa, se seleccionó el medio 1, Leche de Soya básico, para su comparación con el medio comercial, según se presenta en la tabla a continuación:

En la Tabla 9, se muestran los resultados de los recuentos microbianos para los diferentes medios utilizados, 1 y 2, al cabo de 96 h de incubación a 23°C, en 8 lecturas realizadas, por medio y por aislamiento.

**Tabla 9.** Recuentos microbianos de microorganismos lácticos en los diferentes medios utilizados al cabo de 96 h de incubación a 23°C, en 4 lecturas realizadas, por medio y por aislamiento.

<b>Microorganismo</b>	<b>Medio</b>	<b>Recuento Promedio ufc/ml (N = 4)</b>
<b>C12SMT</b>	1	$8 \times 10^6$
	2	$4 \times 10^7$
<b>C13SMT</b>	1	$8,1 \times 10^6$
	2	$3 \times 10^5$
<b>C14SMT</b>	1	$8 \times 10^6$
	2	$6 \times 10^5$
<b>C15SMT</b>	1	$9,7 \times 10^6$
	2	$1 \times 10^5$
<b>LEV01SMT</b>	1	$8 \times 10^6$
	2	$7 \times 10^5$

La prueba de t realizada permitió la comparación de las medias, siendo la hipótesis nula correspondiente a la igualdad éstas y asumiendo no igualdad en las varianzas, con un nivel de significancia del 95%. De esta manera, se presentó diferencia estadística entre las medias, a favor del medio de cultivo 1.

Con base en la respuesta de estos aislamientos en los diferentes medios de cultivo evaluados, se seleccionó el medio de cultivo No 1 para la producción masiva en forma individual de estos géneros seleccionados, con miras a su aplicación en las pruebas piloto en campo.

#### **5.1.5 Selección del consorcio microbiano para la obtención de ensilaje**

Los criterios de selección del consorcio microbiano estuvieron basados en el conocimiento de sus características morfológicas, bioquímicas y moleculares.

El consorcio estuvo conformado por los géneros de bacterias lácticas: C12SMT, C13SMT, C14SMT y C15SMT, más la levadura procedente de silo LEV01SMT (fuente natural), los

cuales fueron cultivados en forma individual en el medio básico seleccionado a base de leche de soya.

Teniendo en cuenta que el período de deterioro aerobio que transcurre en el proceso de ensilaje incluye una primera etapa correspondiente al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos responsables de la conservación del ensilaje, por acción de las levaduras presentes en el material objeto de ensilaje (Garcés, 2004), en el presente estudio se incorporó la levadura aislada del jugo de maíz al consorcio de las BAL, empleado para la inoculación de la UPA y el Maíz, en la fase piloto en campo.

### **5.1.6 Fermentación en fase sólida en UPA y Maíz a partir de los consorcios microbianos seleccionados.**

#### **Ensayo 1: Industria Licorera de Caldas**

A continuación se relaciona el resultado del análisis bromatológico de las muestras analizadas en el laboratorio de Química de la Universidad Nacional, Sede Manizales al cabo del proceso de ensilaje del material a base de uva pasa y algarrobo (UPA) de la Industria Licorera de Caldas:

#### **Muestra # 1**

**Tipo de Muestra:** Silo

**Identificación:** Uva pasa algarrobo UPA (Testigo) (Fecha de recolección de la muestra: noviembre 9/15)

**Tabla 10.** Análisis bromatológico y microbiológico del ensilaje obtenido a partir de Uva Pasa y Algarrobo (Tratamiento Testigo).

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>FECHA ANÁLISIS</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>MÉTODO</b>
pH	2015/11/10	Unidades de pH	3,94	ASTM E 70
Humedad	2015/11/09	%	78,92	Secado en estufa (80°C)
Cenizas (BS)	2015/11/09	%	3,07	Calcinación (550°C)
Proteína Total (BS)	2015/11/12	%	11,50	Kjeldhal
Fibra Cruda (BS)	2015/11/23	%	32,96	Gravimétrico
Análisis Microbiológico (UFC/ml BAL)/ Tiempo 0– Tiempo 65 días (Silo obtenido)				Tiempo 0: Microbiota Nativa Tiempo 65 días: $1,2 \times 10^7$ /ml

BS: Base Seca/Constante empleada para proteína: 6,25.

## **Muestra # 2**

**Tipo de Muestra:** Silo

**Identificación:** Uva Pasa Algarrobo UPA con adición de inóculo BAL (Tratamiento) (Fecha de recolección de la muestra: noviembre 9/15).

**Tabla 11.** Análisis bromatológico y microbiológico del ensilaje obtenido a partir de Uva Pasa y Algarrobo UPA (Tratamiento con adición de inóculo BAL) .

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>FECHA ANÁLISIS</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>MÉTODO</b>
pH	2015/11/10	Unidades de pH	3,68	ASTM E 70
Humedad	2015/11/09	%	78,21	Secado en estufa (80°C)
Cenizas (BS)	2015/11/09	%	2,62	Calcinación (550°C)
Proteína Total (BS)	2015/11/12	%	7,51	Kjeldhal
Fibra Cruda (BS)	2015/11/23	%	29,44	Gravimétrico
Análisis Microbiológico (UFC/ml BAL)  Tiempo 0 (consorcio aplicado al material) / Tiempo 65 días (Silo obtenido)	<p style="text-align: center;">Tiempo 0: <math>3,7 \times 10^7</math> /ml/ Tiempo 65 días: <math>1,1 \times 10^7</math> /ml</p>			

BS: Base Seca/Constante empleada para proteína: 6,25.

**Tabla 12.** Análisis Bromatológico y Microbiológico Comparativo del Ensilaje obtenido a partir de Uva Pasa Algarrobo UPA (Testigo) vs Uva Pasa Algarrobo UPA (Tratamiento con adición de inóculo BAL).

DETERMINACIÓN	UNIDADES	COMPARATIVO RESULTADOS		ACCIÓN DE BAL SOBRE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL SILO
		SILO UPA TESTIGO	SILO UPA TRATAMIENTO	
pH	Unidades de pH	3,94	3,68	Reducción de pH, mayor estabilidad del silo
Humedad	%	78,92	78,21	No se presenta variación considerable
Cenizas (BS)	%	3,07	2,62	Reducción
Proteína Total (BS)	%	11,50	7,51	Franca reducción
Fibra Cruda (BS)	%	32,96	29,44	Reducción moderada
Análisis Microbiológico Silo obtenido	UFC/ml BAL	$1,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	La población de BAL se mantiene constante durante el proceso

**Ensayo 2: Finca la Camelia.**

**Muestra # 3**

**Tipo de Muestra:** Maíz.

**Identificación:** Maíz antes del ensilaje (Fecha de recolección de la muestra: septiembre 8/15).

**Sitio:** Finca la Camelia.

**Tabla 13.** Análisis Bromatológico de Maíz previo al proceso de ensilaje.

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>FECHA ANÁLISIS</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>MÉTODO</b>
pH	2015/11/12	Unidades de pH	8,38	ASTM E 70
Humedad	2015/11/12	%	85,89	Secado en estufa (80°C)
Cenizas (BS)*	2015/11/12	%	15,02	Calcinación (550°C)
Proteína Total (BS)	2015 /11/12	%	8,11	Kjeldhal
Fibra Cruda (BS)	2015/11/23	%	26,03	Gravimétrico

BS: Base Seca/Constante empleada para proteína: 6,25

#### **Muestra # 4**

**Tipo de Muestra:** Ensilaje

**Identificación:** Tratamiento Maíz adicionado con inóculo BAL (noviembre 1/15)

**Sitio:** Finca la Camelia.

**Tabla 14.** . Análisis bromatológico y microbiológico del ensilaje obtenido a partir de Maíz (Tratamiento adicionado con inóculo BAL)

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>FECHA ANÁLISIS</b>	<b>UNIDADES</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>MÉTODO</b>
pH	2015/11/10	Unidades de pH	5,10	ASTM E 70
Humedad	2015/11/09	%	84,57	Secado en estufa (80°C)
Cenizas (BS)*	2015/11/09	%	13,07	Calcinación (550°C)
Proteína Total (BS)	2015/11/12	%	8,49	Kjeldhal
Fibra Cruda (BS)	2015/11/23	%	34,00	Gravimétrico
Análisis Microbiológico (UFC/g BAL)  Tiempo 0 – 54 días			Tiempo 0: $4,1 \times 10^6$ /ml /  Tiempo 54 días: $1,1 \times 10^6$ UFC/ml. BAL	

BS: Base Seca/Constante empleada para proteína: 6,25

Nota: Al momento de la recolección de la muestra para evaluación del proceso de ensilaje, se presentó una dificultad para la recuperación de la muestra testigo. De esta manera, la comparación se realizará con base en las características de este material, referidas en literatura.

La Tabla 15 a continuación, muestra el comportamiento de algunos parámetros bromatológicos registrados en maíz ensilado en el presente estudio, con respecto a valores de maíz ensilado, registrados en literatura:

**Tabla 15.** Análisis Bromatológico y Microbiológico Comparativo del Ensilaje Silo Maíz Testigo\*\* vs Silo Maíz (Tratamiento con adición de inóculo BAL)

DETERMINACIÓN	UNIDADES	ANÁLISIS BROMATOLÓGICO		ACCIÓN DE BAL SOBRE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL SILO
		SILO MAÍZ TESTIGO**	SILO MAÍZ TRATAMIENTO	
pH	Unidades de pH	< 4,0	5,10	Incremento de pH, menor estabilidad del silo por la posibilidad de deterioro por contaminación
Humedad	%	76,5% y 85,5%	84,57	No se presenta variación considerable
Cenizas (BS)		4,80*	13,07	Incremento considerable, que permite asumir que no hubo asimilación adecuada de nutrientes por parte de la microbiota presente en el material
Proteína Total (BS)		9,27±0,035	8,49	
Fibra Cruda (BS)			34,00	

\*\* Registros de literatura. Datos teóricos referenciados en Calsamiglia *et al.*, 2004; Boschini, y Elizondo, 2003; Cubero, 2010; Ocanto, *et al.*, 2013 ).

Calsamiglia *et al.*, 2004 afirman que la aptitud al ensilaje del maíz es buena, debido a su oferta de carbohidratos para la producción de ácido láctico, su bajo poder tampón que permite que el pH baje rápidamente y su elevado contenido de materia seca. Los resultados obtenidos en el material ensilado a base de Maíz en el presente estudio, muestran un proceso de ensilaje parcial, a juzgar por las condiciones de pH y Cenizas registrados en el análisis bromatológico, que fueron superiores a los registros de maíz ensilado. Los ensilados de maíz deben poseer un pH bajo, cercano o por debajo de 4 y los contenidos en nitrógeno amoniacal y en nitrógeno soluble deben ser inferiores al 10% y al 50% del nitrógeno total, respectivamente.

Contrario al registro de pH del silo de maíz tratamiento, adicionado con BAL (5,10), Boschini y Elizondo, 2003, afirman que los valores de pH bajos describen el efecto de la incorporación del inóculo microbial (bien sea comercial o producido en finca) en un ensilaje, debido a que propician un proceso de fermentación láctica más intenso, reduciendo por ende las pérdidas por descomposición anaeróbica y evitando el crecimiento de microorganismos no deseables para la obtención de un ensilaje adecuado.

En cuanto a la preferencia de consumo de ensilaje por parte de los animales, Shaver *et al.*, 1984, describen un rango de optimización del consumo de ensilaje en un pH comprendido entre 4,46 y 5,62, que coincide con el valor de pH registrado en el silo de maíz tratamiento del presente estudio. Esto se explica por el aumento en la producción de ácido láctico atribuido a la adición del inóculo microbial.

Con relación al contenido de cenizas del ensilaje inoculado en el presente estudio, Hoffman, 2005, afirma que los contenidos de cenizas mayores del 10% en un ensilaje de maíz, indican contaminación por suelo en la muestra analizada. Otros autores mencionan porcentajes de cenizas de 5,5% y 4,5 - 4,7%, respectivamente, para ensilajes de maíz con inóculo (MacDonald, 1981 y Johnson *et al.*, 2002.)

Cubero, 2010 realizó estudios de ensilaje de maíz con adición de inóculos microbianos en condiciones de finca. Los hallazgos permitieron confirmar que este ensilaje incrementaba sus contenidos de proteína cruda, en virtud del nitrógeno aportado por los microorganismos adicionados, sin embargo, se presentaba una reducción en otros parámetros, tales como

materia seca, fibra detergente neutra y fibra detergente ácida, atribuida al aporte de humedad del tratamiento a base del inóculo incorporado.

La Tabla 16 a continuación, muestra el comportamiento de algunos parámetros bromatológicos evaluados en maíz fresco, previo al proceso de ensilaje y maíz ensilado:

**Tabla 16.** Análisis bromatológico y microbiológico comparativo de material fresco y ensilado a base de maíz

Característica evaluada	Maíz	
	Fresco	Ensilado
pH	8,38	5,10
Humedad %	85,89	84,57
Cenizas (BS) %	15,02	13,07
Proteína Total (BS) %	8,11	8,49
Fibra cruda %	26,03	34,00
Recuento microbiológico	4 x 10 <sup>6</sup> UFC/g. BAL	1,1 x 10 <sup>6</sup> UFC/g. BAL

Fuente: FEDNA, 2004.

Wattiaux, M, 2005, plantean con respecto al cambio en la composición forrajera de un silo y específicamente, a la pérdida de carbohidratos solubles y proteína, que a medida que la materia seca se va perdiendo durante e proceso de ensilado, la composición forrajera también cambia. Los cambios en la composición de materia seca se explican porque la mayoría de los nutrientes (carbohidratos solubles y proteínas) son los primeros en perderse durante la respiración y fermentación, y en los efluentes (jugos). De otra parte, por el efecto de estas pérdidas, se incrementa la fibra, lo que se ve reflejado en los valores de fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN), los cuales tienden a aumentar en el ensilaje con respecto al forraje recién cortado. Los hallazgos del presente estudio coinciden con estas afirmaciones de Wattiaux, M, 2005, en cuanto en el ensilado de maíz se registra una reducción de Cenizas (en las cuales se incorporan los carbohidratos), con respecto al forraje a base de

maíz fresco. De igual manera se evidenció el incremento en el % de fibra del maíz ensilado, con respecto al forraje de maíz fresco.

De igual forma, Wattiaux, M, 2005, con relación a los cambios en la fracción proteica (nitrógeno), afirman que el ensilado cambia la fracción de proteína de los forrajes. La respiración es responsable de la ruptura de la proteína. A medida que la planta muere luego de cortada, las enzimas proteolíticas se rompen en componentes mas pequeños, solubles, incluyendo péptidos, aminoácidos (el bloque constructor de la proteína) y amoníaco. La mayor degradación de proteína que tiene lugar en un silo, ocurre las primeras 24 a 72 horas (fase 1 y fase2) de la fermentación del ensilaje). Para cuando el pH está alrededor de 4.0, las enzimas proteolíticas han perdido 65 a 85% de su actividad. Consecuentemente, una rápida caída en el pH es deseable para reducir la cantidad de ruptura de proteína en un silo. La respuesta de ensilaje de maíz, adicionado con BAL, en el presente estudio, coincide con estos hallazgos, en cuanto no se registra una reducción en el contenido de proteína, sino más bien un leve incremento, que puede obedecer al valor de pH registrado al momento de la apertura del silo (pH 5,10).

Chaverra y Vernal (2000) registran que contenidos mayores a 12% de cenizas en materiales ensilados a base de maíz, son asociados a contaminación con suelo durante la cosecha o elaboración del ensilaje lo que favorece la presencia de fermentaciones secundarias y reducción del consumo. El contenido de cenizas de la UPA testigo y la UPA ensilada mostró unos % muy bajos (3,07 vs 2,62), lo que puede ser inherente a la composición nutricional del material y particularmente, al contenido de carbohidratos, sin embargo, el contenido de cenizas del ensilaje de maíz mostró valores superiores al 13%, lo que puede explicar la presencia de fermentaciones secundarias que no modificaron el consumo de carbohidratos.

Tobía *et al.* (2003) manifiestan que el pH de un material ensilado debe ubicarse entre 3,9 y 4,2 para ensilajes con una adecuada calidad e intensidad del proceso fermentativo, siendo considerados satisfactorios, ya que este indicador presenta alta correlación con la intensidad y calidad del proceso fermentativo que ocurre en los ensilajes. En el presente estudio, este comportamiento en los valores de pH se obtuvo en el ensilaje de UPA, el cual registró valores entre 3,94 y 3,68, en silo UPA Testigo y en silo adicionado con BAL y fuente proteica,

respectivamente, sin embargo, los valores de pH del silo de maíz adicionado con BAL y fuente proteica, mostraron un valor de pH final de 5,10.

De igual manera, los valores de pH y % de ceniza registrados en el silo de maíz adicionado con BAL y fuente proteica reflejan una actividad fermentativa incompleta, o quizás alterada por otras rutas metabólicas dirigidas por otros microorganismos presentes en el material, cuyos productos finales no pertenecen a aquellos registrados en las bacterias lácticas heterofermentativas u homofermentativas. En consecuencia, es posible que al momento de apertura del silo de maíz, para la toma de la muestra, el material no hubiera logrado estabilizarse como fruto del proceso fermentativo realizado por las bacterias lácticas.

(Ocanto *et al.*,2013) afirman que el pH es un indicador primordial en el proceso de conservación de un ensilaje, debido a que es una de las transformaciones más radicales que ocurren en el forraje en función de los procesos degradativos de éste.

El análisis microbiológico de la UPA adicionada con BAL, no mostró diferencias apreciables en la variable concentración, evaluada a través del conteo de UFC/ml, con respecto a la UPA Testigo, lo que refleja estabilidad de estas poblaciones microbianas en el material, en términos de concentración, pero con una mayor actividad metabólica en el material inoculado con BAL y fuente proteica.

### **5.1.7 Características de color textura y palatabilidad del silo a base de UPA y de Maíz**

Los materiales ensilados a base de UPA y Maíz, adicionados con BAL y fuente proteica, mostraron al momento de la apertura del silo, un olor característico de la acción fermentativa de las BAL en este tipo de materiales, al igual que una textura propia de esta transformación de forraje fresco a material ensilado, con respecto a los referidos por Franco *et al.*, 2007.

Tanto el silo obtenido de UPA como de Maíz, adicionados con BAL y fuente proteica, fueron suministrados a bovinos de ceba con una excelente aceptación, en términos de consumo inmediato de estos materiales. Esta respuesta ratifica la palatabilidad de estos materiales y para el caso específico del ensilaje de maíz tratamiento (pH 5,1) del presente estudio, coincide con

los registros de Shaver *et al.*, 1984, quienes describen un rango de optimización del consumo de ensilaje para el animal, en un pH comprendido entre 4,46 y 5,62.

## 6 CONCLUSIONES

En el presente estudio se aislaron e identificaron bacterias lácticas (BAL) y una levadura, a partir de fuentes alimenticias y naturales.

Se seleccionaron estas bacterias y la levadura, con base en pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares, para el desarrollo de un consorcio microbiano dirigido a la obtención de ensilaje adicionado con BAL, levadura y una fuente proteica como base nutritiva.

Se seleccionó un medio de cultivo para la producción masiva de estas BAL y la levadura, con fines de producción industrial y con base en criterios establecidos por el equipo técnico de la empresa SMT.

Se llevó a cabo un procedimiento para la formulación en gel de una de las BAL seleccionadas para la conformación del inóculo o consorcio microbiano.

Las pruebas en campo con materiales a base de UPA y de Maíz, a través del empleo del inóculo BAL seleccionado, con fuente proteica, para la producción de ensilaje, mostraron que el mejor ensilaje se obtuvo a partir de la UPA, y aún más, de la UPA con la adición de inóculo BAL, lo que mostró diferencias evidentes en los registros de cenizas, proteína y fibra, con reducciones apreciables con respecto a la UPA no adicionada con BAL (UPA Testigo), que explican un mayor consumo de nutrientes del material, como resultado del metabolismo fermentativo de las BAL adicionadas con su fuente proteica.

## 7 REFERENCIAS

- Adagrocolombia.blogspot.com. (2015). Todo lo que debe saber del ensilaje para ganado bovino. Disponible en: <http://www.contextoganadero.com/blog/todo-lo-que-debe-saber-del-ensilaje-para-ganado-bovino>. Consultado el: 20 de febrero de 2016.
- Aquihuatl. M. (2012). Manual de Practicas de Laboratorio. Universidad Autonoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Casa Abierta al tiempo, p. 69-75.
- Argumentería G., de la Roza, B., Martinez, A., Sanchez, L. & Martínez, A. (1997). El ensilado en Asturias. Centro de Investigación Aplicada y Tecnología Agroalimentaria (CIATA), p. 1-127.
- Boschini, C. & Elizondo, J. (2003). Curso teórico práctico de ensilaje de forrajes. Serie Agrotecnología I. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José. p. 3-29.
- Cabeza, E. (2006). Bacterias Ácido Lácticas (BAL): Aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Universidad de Pamplona. Colombia.
- Cañete M. & Sacha, J. (1998). Ensilado de forrajes y su empleo en la alimentación de rumiantes. P. 1-260.
- Cubero, J; Rojas, A. (2010). Uso del Inóculo Microbial elaborado en finca en ensilaje de maíz. Valor Nutricional y Fermentativo. Agronomía Costarricense: 237-250.
- De la Roza, B. 2005. El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. IV Jornada de Alimentación Animal. Laboratorio de Mouriscade. Lalín (Pontevedra), p 1-20.
- Ellis, J., Bannink, I.K., Hindrichsen, R.D., Kinley, W.F., Pellikaan, N., Milora. (2016). The effect of lactic acid bacteria included as a probiotic or silage inoculant on in vitro rumen digestibility, total gas and methane production. *Animal Feed Science and Technology* 211 (61–74).
- Franco, L; Calero, D; Ávila, P. (2007). Alternativas para la Conservación de Forrajes. Gobernación del Valle del Cauca, Secretaría de Agricultura y Pesca. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical. Palmira- Valle del Cauca.
- Garcés, A. (2004). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. Línea de Investigación: Bioprocesos. Disponible en: <http://www.lasallista.edu.co/fxcul/media/pdf/Revista/Vol1n1/066-71%20Ensilaje%20como%20fuente%20de%20alimentaci%3%b3n%20para%20el%20ganado.pdf>. Consultado el: 17 de noviembre de 2013.
- Giraldo, J (2014). Informe Trabajo Académico: Producción de Inóculo Microbiano para Ensilaje Animal. Universidad Católica de Manizales. Facultad de Ciencias de la Salud. Manizales, Colombia.

- Hoffman P. 2005. Ash content of forages. College of Agricultural & Life Sciences. University of Wisconsin. USA. Focus on Forage 7(1). 2p.
- ISO/TS 11133-1: 2009. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. [http://www.scharlabmagyarorszag.hu/katalogus/064-PA0007\\_EN.pdf](http://www.scharlabmagyarorszag.hu/katalogus/064-PA0007_EN.pdf). Consultado el: 13 de marzo de 2016.
- Jobim, C., Nussio, L., Reis, R. & Schmidt, P. 2007. Avancos metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. Revista brasileira de zootecnia. V. 36, suplemento especial, p. 101-119.
- Johnson L; Harrison J; Davidson D; Robutti J; Swift M. (2002). Corn silage management I Effect of hybrid, maturity, and mechanical processing on chemical and physical characteristics. Journal of Dairy Science 85(4):833-853.
- McDonald P. (1981). The biochemistry of silage. John Wiley & Sons. Chichester, University of Edinburgh. 226 pp.
- Martínez, M (2014). Informe Trabajo Académico: Producción de Inóculo Microbiano para Ensilaje Animal. Universidad Católica de Manizales. Facultad de Ciencias de la Salud. Manizales, Colombia.
- Merck Microbiology Manual. 12 Edition. P. 354-356.
- Mier, Q. (2009). Caracterización del Valor Nutritivo y Estabilidad Aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero. Trabajo de fin de Master.
- Ocanto, G., Acevedo, I. & García, O. (2013). Evaluación de las características fisicoquímicas y funcionales del ensilaje de maíz (*zea mays*) y ensilaje de sorgo (*sorghum vulgare*). Municipio Urdaneta del estado Lara. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Venezuela.
- Prácticas para un buen ensilaje. (2012). Tres videos con recomendaciones útiles para el manejo del silo. Disponible en: <http://tropicalcis.com/practicas-para-un-buen-silaje/>. Consultado el: 13 de enero de 2016.
- Proyecto “Ganadería Colombiana Sostenible”. (2004). Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria. Disponible en: [http://www.cipav.org.co/areas\\_de\\_investigacion/Ganaderia\\_colombiana\\_sostenible\\_que\\_es.html](http://www.cipav.org.co/areas_de_investigacion/Ganaderia_colombiana_sostenible_que_es.html). Consultado el: 15 de noviembre de 2013.
- Quirós, E. (2009). Corporación Ganadera (CORFOGA). Recomendaciones para enfrentar el impacto de la sequía en la Ganadería. Disponible en: [www.corfoga.org/.../documentos/pdf/recomendaciones\\_ante\\_sequia.pdf](http://www.corfoga.org/.../documentos/pdf/recomendaciones_ante_sequia.pdf). Consultado el: 16 de noviembre de 2013.
- Román, Jorge André (2012). Pruebas Bioquímicas de Identificación. Microbiología de Alimentos II. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Licenciatura en Nutrición.

- Shaver, S; Erdman R; Vandersall J. (1984). Effects of silage pH on voluntary intake of corn silage. *Journal Dairy Science* 67(9): 2045-2049.
- Stefanie, J., Driehuis, F., Gottschal, J. & Spoelstra, S. (1999). Silage fermentation processes and their manipulation. FAO Electronic Conference on Tropical Silage. <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/agp/agpc/gp/silage/contents>. Htm. Paper 2. Consultado el 20 de marzo de 2016.
- Stefanie, J., Elferink, O., Driehuis, F., Gottschal, J. y Spoelstra, F. (2001). Los Procesos de Fermentación del Ensilaje y su manipulación. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/X8486S/x8486s04.htm>. Consultado el: 17 de noviembre de 2013.
- Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. 2004. S. Calsamiglia, A. Ferret, A. Bach. Fundación para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, 70 pp. (<http://www.fundacionfedna.org/forrajes/ensilado-de-maiz>)
- Tobia, C., Uribe, L., Villalobos, E., Soto, H. & Ferris, I. (2003). Aislamiento, selección y caracterización de bacterias ácido lácticas en ensilajes de soya. *Agronomía Costarricense* 27(2):21-27.
- Vanguardia.com. (2013). Sector ganadero requiere inversión de \$5 billones para no sucumbir ante TLC. Disponible en: <http://m.vanguardia.com/santander/barrancabermeja/197195-sector-ganadero-requiere-inversion-de-5-billones-para-no-sucumbir-a>. Consultado el: 16 de noviembre de 2013.
- Vieira da Cunha, M. (2009). Conservacao de forragem. Pesquisador da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuaria (IPA) e Doutorando do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da UFRPE, p. 1-26.
- Wattiaux, M. (2005). Novedades lácticas, Feeding No 502. Universidad de Wisconsin (<http://datateca.unad.edu.co/contenidos/352001/ENSILAJE.pdf>) Consultado el: 22 de noviembre de 2015.
- VIDEO: Tierra, pastos y ganado. (2009). Aprendiendo en el campo. <https://www.youtube.com/watch?v=D26dTkK5P7M>. Consultado el: 23 de diciembre de 2015.

## ANEXO NÚMERO 1

### Lecturas de la variable UFC/ml y comparación de medias de tratamientos a través de la prueba de t.

Microorganismo	Medio	Recuentos				Promedio (N=4)
<b>C12SMT</b>	1	9x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>6</sup>
	2	3x10 <sup>7</sup>	4x10 <sup>7</sup>	3x10 <sup>7</sup>	6x10 <sup>7</sup>	4x10 <sup>7</sup>
<b>C13SMT</b>	1	7,4x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>6</sup>	10x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>6</sup>	8,1x10 <sup>6</sup>
	2	2x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>5</sup>
<b>C14SMT</b>	1	10x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>6</sup>
	2	7x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>
<b>C15SMT</b>	1	9x10 <sup>6</sup>	10x10 <sup>6</sup>	11x10 <sup>6</sup>	8,8x10 <sup>6</sup>	9,7x10 <sup>6</sup>
	2	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>
<b>LEV01SMT</b>	1	8x10 <sup>6</sup>	7x10 <sup>6</sup>	9x10 <sup>6</sup>	8x10 <sup>6</sup>	8 x10 <sup>6</sup>
	2	8x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>	8x10 <sup>5</sup>	7 x10 <sup>5</sup>

#### Comparison of Means

95,0% confidence interval for mean of medio1: 6,7673 +/- 0,178577

95,0% confidence interval for mean of medio2: 5,91997 +/- 0,429908

95,0% confidence intervals for the difference between the means: assuming equal variances:

0,847335 +/- 0,450258 not assuming equal variances: 0,847335 +/- 0,457738

#### t tests to compare means

Null hypothesis: mean1= mean2

(1) Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = 3,80969      P-value = 0,000494503

not assuming equal variances: t = 3,80969      P-value = 0,000791162

(2) Alt. hypothesis: mean1 > mean2

assuming equal variances: t = 3,80969      P-value = 0,000247251

not assuming equal variances:  $t = 3,80969$  P-value = 0,000395581

(3) Alt. hypothesis:  $\text{mean1} < \text{mean2}$

assuming equal variances:  $t = 3,80969$  P-value = 0,999753

not assuming equal variances:  $t = 3,80969$  P-value = 0,999604

#### The StatAdvisor

This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from 0,389597 to 1,30507. Since the interval does not contain the value 0.0, there is a statistically significant difference between the means of the two samples at the 95,0% confidence level. The t-tests can also be used to arrive at the same conclusion. P-value below 0,05 indicate significant differences between the two means.

NOTE: the interval used above does not assume that the variances of the two samples are equal. This was determined by running an F-test to compare the standard deviations of the two samples. You can see the results of that test by selecting Comparison of Standard Deviations from the Tabular Options menu.