



**Efecto de un inóculo de bacterias ácido-lácticas sobre la calidad nutricional y fermentativa de silo de avena (*Avena sativa*)**

Tingo Jácome, Francisco Javier

Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología

Centro de Posgrados

Maestría en Producción y Nutrición Animal

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magíster en Producción y Nutrición Animal

Ing. Agp. Gutiérrez León, Francisco Adolfo Mg.

18 de Agosto del 2020

## Resultado de verificación Urkund



## Document Information

Analyzed document	ING. JAVIER TINGO.docx (D78043876)
Submitted	8/21/2020 6:24:00 PM
Submitted by	Ortiz Manzano Mario Leonardo
Submitter email	mlortiz@espe.edu.ec
Similarity	9%
Analysis address	mlortiz.espe@analysis.orkund.com

## Sources included in the report

SA	TESIS CHEVEZ.pdf Document TESIS CHEVEZ.pdf (D12468360)		5
W	URL: <a href="https://docplayer.es/88847217-Universidad-de-san-carlos-de-guatemala-centro-univer...">https://docplayer.es/88847217-Universidad-de-san-carlos-de-guatemala-centro-univer ...</a> Fetched: 8/7/2020 5:31:32 AM		5
SA	JIMMY BERNARDO ROSADO LITARDO.pdf Document JIMMY BERNARDO ROSADO LITARDO.pdf (D11288603)		1
SA	TESIS COMPLETA DE ZAMBRANO JORGE.docx Document TESIS COMPLETA DE ZAMBRANO JORGE.docx (D10311185)		2
SA	Ensilaje trabajo de titulación Vera y Zambrano (Urkund).docx Document Ensilaje trabajo de titulación Vera y Zambrano (Urkund).docx (D51747377)		1
W	URL: <a href="https://fyl.uwex.edu/forage/files/2014/01/Microbial-Inoculants-for-Silage-Espanol.pdf">https://fyl.uwex.edu/forage/files/2014/01/Microbial-Inoculants-for-Silage-Espanol.pdf</a> Fetched: 8/21/2020 6:24:00 PM		1
SA	tesis de Jairo.docx Document tesis de Jairo.docx (D10326476)		3
SA	Valle Proyecto ok.docx Document Valle Proyecto ok.docx (D35623772)		1
SA	tesis CARLOS ROMAN1.3.docx Document tesis CARLOS ROMAN1.3.docx (D11226828)		1
W	URL: <a href="https://www.researchgate.net/publication/280946971_Ensilaje_de_pasto_Estrella_Afri...">https://www.researchgate.net/publication/280946971_Ensilaje_de_pasto_Estrella_Afri ...</a> Fetched: 7/15/2020 5:45:44 PM		2
J	Evaluación nutricional de ensilado cebada - vicia en diferentes proporciones, con y sin urea al 1% en la Región Huancavelica URL: 8528c26f-d936-4f74-9cef-6e901a2354a1 Fetched: 3/10/2019 3:22:10 PM		2
W	URL: <a href="https://docplayer.es/24877867-Universidad-politecnica-salesiana-sede-quito.html">https://docplayer.es/24877867-Universidad-politecnica-salesiana-sede-quito.html</a> Fetched: 11/26/2019 1:53:03 AM		1

**URKUND**

<b>W</b>	URL: <a href="https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2328/FV-33778.pdf">https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2328/FV-33778.pdf ...</a> Fetched: 8/21/2020 6:24:00 PM		2
<b>SA</b>	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / tesis jaír isabel.docx Document tesis jaír isabel.docx (D22599777) Submitted by: alcaizay@gmail.com Receiver: ceulloa1.espe@analysis.orkund.com		5
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.coolibri.udelar.edu.uy/psul/bitstream/20.600.12008/10414/1/FV-32609.pdf">https://www.coolibri.udelar.edu.uy/psul/bitstream/20.600.12008/10414/1/FV-32609.pdf</a> Fetched: 6/16/2020 4:03:14 PM		7



Ing. Agr. Gutiérrez León, Francisco Adolfo, Mg

Director

C.C.: 0603145244



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

CENTRO DE POSGRADOS

### CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Efecto de un inóculo de bacterias ácido-lácticas sobre la calidad nutricional y fermentativa de silo de avena (*Avena sativa*)” fue realizado por el señor **Tingo Jácome, Francisco Javier** el mismo que ha sido revisado y analizado en su totalidad, por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 18 de agosto del 2020

Una firma manuscrita en tinta azul que parece ser "Ing. Agp. Gutiérrez León, Francisco Adolfo, Mg".

---

Ing. Agp. Gutiérrez León, Francisco Adolfo, Mg

Director

C.C.: 0603145244



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

CENTRO DE POSGRADOS

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Tingo Jácome, Francisco Javier**, con cédula de ciudadanía n°1717947038, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Efecto de un inóculo de bacterias ácido-lácticas sobre la calidad nutricional y fermentativa de silo de avena (*Avena sativa*)** es de mí autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 18 de agosto del 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Francisco Jácome', written over a horizontal dotted line.

Tingo Jácome, Francisco Javier

C.C.: 1717947038



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

CENTRO DE POSGRADOS

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Tingo Jácome, Francisco Javier** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Efecto de un inóculo de bacterias ácido-lácticas sobre la calidad nutricional y fermentativa de silo de avena (*Avena sativa*)** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 18 de agosto del 2020

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Tingo Jácome".

Tingo Jácome, Francisco Javier

C.C.: 1717947038

### **Dedicatoria**

A Dios por su bondad e infinita gracia, a mis padres Segundo y Rosario, a mi hermana Amparo, a mi sobrino Ronny y a mi abuelita Concepción, por su apoyo incondicional y por ser el motor para cumplir con esta meta.

## **Agradecimientos**

A Dios por darme la suficiente fuerza espiritual para poder cumplir con cada una de mis metas anheladas en cada etapa de mi vida, a mi familia por su ayuda, consejos y enseñanzas, a Yessy Guerra por su apoyo y compañía y a todas las personas que de manera desinteresada hicieron posible la culminación de este proyecto, en especial al Ing. Francisco Gutiérrez por su guía y apoyo como director, al coordinador de la Maestría en Producción y Nutrición Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE Ing. Mario Ortiz Manzano por toda su ayuda en esta etapa de aprendizaje.

Al equipo técnico del Centro de Biología y Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Central del Ecuador por su colaboración y participación en el desarrollo de esta investigación.

## Índice de Contenido

Resultado de Verificación Urkund .....	2
Certificación .....	4
Responsabilidad de Autoría .....	5
Autorización de Publicación.....	6
Dedicatoria.....	7
Agradecimientos .....	8
Índice de Contenido.....	9
Índice de Tablas .....	13
Índice de Figuras .....	14
Resumen .....	15
Capítulo I .....	17
Objetivos .....	18
<i>Objetivo General</i> .....	18
<i>Objetivos Específicos</i> .....	18
Capítulo II.....	20
Revisión de Literatura.....	20
<i>Conservación de Forrajes</i> .....	20
<i>Ensilaje</i> .....	20
Proceso Fermentativo. ....	21
<i>Fase 1 (Aeróbica)</i> . ....	21
<i>Fase 2 (Fermentativa)</i> .....	21
<i>Fase 3 (Estable)</i> .....	21
<i>Fase 4 (Deterioro Aeróbico)</i> . ....	22
<i>Uso de Aditivos en la Elaboración de Ensilajes</i> .....	22

<i>Inóculos Microbianos</i> .....	23
<i>Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)</i> .....	24
Homofermentativas. ....	24
Heterofermentativas. ....	24
Efecto de las Bacterias Acido Lácticas Homo Fermentativas Sobre el Ensilaje..	25
Efecto de las Bacterias Acido Lácticas Heterofermentativas Sobre el Ensilaje..	25
<i>Evaluación de la Calidad de los Ensilajes</i> .....	26
Indicadores Físico – Químicos. ....	26
Indicadores Organolépticos.....	27
<i>Ventajas y Desventajas del Ensilaje</i> .....	27
Capítulo III.....	29
Materiales y Métodos.....	29
<i>Ubicación del Lugar de la Investigación</i> .....	29
<i>Ubicación Política</i> .....	29
<i>Ubicación Geográfica</i> .....	29
Materiales y Equipos.....	29
Aislamiento de Bacterias Acido-Lácticas Epífitas. ....	29
<i>Materiales y Equipos de Campo.</i> ....	29
<i>Materiales y Equipos de Laboratorio.</i> .....	30
Implementación de Tratamientos y Evaluación Nutricional y Fermentativa de Microsilos. ....	31
<i>Materiales de Campo</i> .....	31
<i>Equipos de Campo.</i> ....	31
<i>Materiales de Laboratorio.</i> ....	31
<i>Equipos de Laboratorio.</i> .....	32
<i>Reactivos</i> .....	33

<i>Métodos</i> .....	33
Factores en Estudio. ....	33
Diseño Experimental. ....	33
Tratamientos en Estudio. ....	34
Características de las unidades experimentales. ....	34
Características de los Grupos Experimentales. ....	35
Identificación de Tratamientos. ....	35
Análisis Funcional. ....	36
Esquema del Análisis de Varianza del Experimento. ....	36
Métodos Específicos del Manejo del Experimento. ....	36
<i>Aislamiento de Bacterias</i> . ....	36
<i>Identificación de BAL</i> . ....	38
<i>Conservación de Bacterias Aisladas</i> . ....	38
<i>Obtención de Forraje para Microsilos</i> . ....	39
<i>Preparación de Tratamientos</i> . ....	39
<i>Variables en Estudio</i> .....	39
Parámetros de Calidad Fermentativa. ....	39
<i>Temperatura</i> . ....	39
<i>pH (Potencial Hidrógeno)</i> . ....	40
Porcentaje de Ácido Láctico (Acidez Titulable) .....	40
Índices de Calidad Nutricional. ....	42
<i>Proteína Bruta (PB)</i> . ....	42
<i>Fibra Detergente Neutro (FDN)</i> .....	44
<i>Fibra Detergente Ácido (FDA)</i> . ....	44
Capítulo IV .....	46
Resultados y Discusión. ....	46

<i>Bacterias Acido-Lácticas Identificadas</i> .....	46
Temperatura.....	48
pH (Potencial Hidrógeno). ....	51
Porcentaje de Ácido Láctico (Acidez Titulable). ....	54
<i>Proteína Bruta (PB)</i> .....	57
<i>Fibra Detergente Neutro (FDN)</i> .....	58
<i>Fibra Detergente Ácido (FDA)</i> .....	60
Capítulo V.....	62
Conclusiones y Recomendaciones.....	62
<i>Conclusiones</i> .....	62
<i>Recomendaciones</i> .....	63
Bibliografía .....	65
Anexos .....	68

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b>	<i>Reacciones de fermentación producidas por bacterias ácido-lácticas.....</i>	25
<b>Tabla 2</b>	<i>Indicadores físico – químicos para valoración de la calidad fermentativa de ensilajes. ....</i>	26
<b>Tabla 3</b>	<i>Indicadores organolépticos para evaluación sensorial de un ensilaje .....</i>	27
<b>Tabla 4</b>	<i>Tratamientos propuestos para este estudio.....</i>	34
<b>Tabla 5</b>	<i>Características de las unidades experimentales.....</i>	35
<b>Tabla 6</b>	<i>Caracterización de los grupos experimentales .....</i>	35
<b>Tabla 7</b>	<i>Esquema de ADEVA por cada tratamiento.....</i>	36
<b>Tabla 8</b>	<i>Clasificación de indicadores sensoriales de un ensilaje .....</i>	37
<b>Tabla 10</b>	<i>Características de colonias aisladas en agar MRS .....</i>	47
<b>Tabla 11</b>	<i>Variación de la temperatura (°C) en función de los días de fermentación del ensilaje en cada tratamiento .....</i>	48
<b>Tabla 12</b>	<i>Variación del pH en función de los días de fermentación del ensilaje en cada tratamiento.....</i>	51
<b>Tabla 13</b>	<i>Cambio del % de Ácido Láctico en función de los días de fermentación del ensilaje en cada tratamiento.....</i>	54

### Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	<i>Variación de la temperatura en función de los días de fermentación .....</i>	<i>49</i>
<b>Figura 2</b>	<i>Cambios del valor de pH en función de los días de fermentación.....</i>	<i>52</i>
<b>Figura 3</b>	<i>Variación del porcentaje de ácido láctico en función de los días de fermentación .....</i>	<i>55</i>
<b>Figura 4</b>	<i>Porcentaje de proteína pre - ensilaje versus valores de proteína obtenidos a finalizar el estudio con cada tratamiento establecido.....</i>	<i>57</i>
<b>Figura 5</b>	<i>Porcentaje de FDN pre - ensilaje en comparación con los tratamientos experimentales .....</i>	<i>58</i>
<b>Figura 6</b>	<i>Porcentaje de FDA del punto cero (10) en comparación con los tratamientos experimentales .....</i>	<i>60</i>

## Resumen

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología del Centro de Biología y la fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Animal de la facultad de Ciencias Agrícolas, ambas dependencias pertenecientes a la Universidad Central del Ecuador. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un inóculo de bacterias ácido lácticas sobre la calidad nutricional y fermentativa de silo de avena; para ello en la primera fase se aislaron dos cepas bacterianas *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus acidophilus*, las que fueron cultivadas en agar MRS y fueron identificadas por pruebas bioquímicas convencionales; en la segunda fase estas bacterias fueron usadas como inóculos vivos sobre avena forrajera, estableciendo 5 tratamientos: un testigo y cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de bacterias ácido-lácticas. Los efectos sobre la temperatura, pH, y porcentaje de ácido láctico se evaluaron durante 40 días y para el análisis de PC, FDN y FDA se realizaron dos muestreos (un inicial y un final luego de 40 días de fermentación); para ello se construyeron 135 microsilos de tubo PVC. Todos los datos fueron evaluados estadísticamente con análisis de Varianza (ADEVA), para las variables con diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) se realizó la prueba de Tukey al 5% para establecer la diferencia entre sus medias. El efecto evidenciado de las bacterias sobre el pH fue que a mayor UFC más bajo nivel de pH a medida que transcurren los días de fermentación; mientras que, con el uso de  $0,5 \times 10^6$  UFC/ml de bacterias ácido lácticas la producción de ácido láctico es mayor, en la variable temperatura no se observó diferencia estadística ( $P > 0,05$ ) en la mayoría de los tratamientos. En los parámetros nutricionales se obtuvo buenos resultados con el tratamiento uno ( $0,5 \times 10^6$  UFC/ml) ya que la pérdida de PC a los 40 días fue mínima, así como también se pudo determinar que los valores tanto de FDA como FDN bajaron considerablemente con este tratamiento mejorando el consumo y la digestibilidad de MS. En este estudio se puede concluir que el uso de bacterias homo fermentativas muestra un efecto positivo sobre la mayoría de las variables de calidad nutricional y fermentativa del ensilaje de avena, determinándose que la cantidad adecuada de unidades formadoras de colonias para ser usadas en ensilajes de avena forrajera es de  $0,5 \times 10^6$  UFC/ml.

### **PALABRAS CLAVES:**

- **AVENA FORRAJERA**
- **BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS**
- **INÓCULOS BACTERIANOS**

### Abstract

The research was carried out in the Microbiology laboratory of the Biology Center and the experimental phase was carried out in the Animal Nutrition laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, both units belonging to the Central University of Ecuador. The objective of this study was to evaluate the effect of an inoculum of lactic acid bacteria on the nutritional and fermentative quality of oat silo; for this, in the first phase two bacterial strains *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus acidophilus* were isolated, which were cultured in MRS agar and were identified by conventional biochemical tests; In the second phase, these bacteria were used as live inoculums on forage oats, establishing 5 treatments: a control and four treatments with different concentrations of lactic acid bacteria. The effects on temperature, pH, and percentage of lactic acid were evaluated for 40 days and for the analysis of CP, NDF and ADF two samples were carried out (an initial and an end after 40 days of fermentation); 135 micro-tubes of PVC were built for this purpose. All data were statistically evaluated with analysis of Variance (ADEVA), for the variables with significant difference ( $P < 0.05$ ) the Tukey test was performed at 5% to establish the difference between their means. The evidenced effect of the bacteria on the pH was that the higher the CFU the lower the pH level as the days of fermentation pass; while, with the use of  $0.5 \times 10^6$  CFU / ml of lactic acid bacteria the production of lactic acid is greater, in the temperature variable no statistical difference ( $P > 0.05$ ) was observed in most treatments. In the nutritional parameters, good results were obtained with treatment one ( $0.5 \times 10^6$  CFU / ml) since the loss of PC at 40 days was minimal, as well as it could be determined that the values of both ADF and NDF fell considerably with this treatment improving the consumption and digestibility of DM. In this study it can be concluded that the use of homo fermentative bacteria shows a positive effect on most of the variables of nutritional and fermentative quality of oat silage, determining that the adequate amount of colony forming units to be used in forage oats silages It is  $0.5 \times 10^6$  CFU / ml.

#### KEYWORDS:

- OATS FORRAGE
- LACTIC ACID BACTERIA
- BACTERIAL INOCULES

## Capítulo I

Los sistemas de alimentación en la mayoría de las explotaciones ganaderas bovinas (leche y/o carne) dependen en alto grado del suministro de alimentos balanceados, los cuales dentro de su formulación incluyen materias primas de alto valor económico, convirtiendo a estos sistemas de producción poco sostenibles y de alto costo.

Las políticas económicas “de libre mercado” que manejan algunos países obligan a los grandes y medianos productores a buscar y diseñar nuevas estrategias de alimentación y de manejo, que les permita enfrentar satisfactoriamente a la competencia de países vecinos; estas estrategias alimentares deben ser poco vulnerables a las condiciones de períodos prolongados de sequía o de lluvia y que aporten a los sistemas productivos suficiente cantidad y calidad de nutrientes a un costo relativamente bajo en épocas de escases, por lo que, la conservación de forrajes mediante el ensilado (forrajes fermentados) surge como una alternativa viable.

El ensilaje es un método de conservación de forrajes con cierto porcentaje de humedad, basado en una fermentación ácido láctica bajo condiciones anaeróbicas, favoreciendo la proliferación de bacterias ácido lácticas propias del material vegetal, éstas fermentan los carbohidratos solubles a ácido láctico y en menor grado a ácido acético (Yitbarek & Tamir, 2014); controlando en gran medida el crecimiento de patógenos y otorgando a los animales una fuente de nutrientes constante y enriquecida.

Aunque se han probado varios métodos como formas eficientes de almacenar y preservar forrajes, es importante tener en cuenta que, en el mejor de los casos, los forrajes conservados raramente pueden igualar el valor nutritivo del forraje fresco porque las pérdidas de nutrientes altamente digestibles (azúcar, proteína y grasa) son inevitables durante la conservación y el almacenamiento (Romero et al., 2015). Sin embargo, mediante

el uso de algunos aditivos se puede mejorar estos valores (Cobos, 2008), siendo los inóculos bacterianos una opción viable.

La adición de inoculantes microbianos conformados a partir de mezclas de bacterias aisladas y caracterizadas, cuya función es la de establecerse como cultivo dominante en el silo y mejorar la eficiencia del proceso del ensilaje, garantizando la inocuidad microbiológica de los sistemas e incrementando la palatabilidad de alimentos ricos en fibra y proteína. (Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011)

En el mercado actual, hay inoculantes que contienen diferentes especies y cepas de bacterias y el efecto de la inclusión de estos inoculantes ha sido variable en la composición química o microbiológica del ensilaje. (Wilkinson, Bolsen, & Lin, 2003)

Dentro de este contexto es necesaria la identificación de microorganismos propios de los forrajes, determinar las asociaciones más eficientes que mejoren la fermentación anaerobia, disminuyendo el tiempo del proceso del ensilaje, prevenir el deterioro aeróbico y obteniendo un producto alternativo con alto valor nutritivo para épocas de escases, que le permitan al productor mejorar parámetros productivos (leche y carne) y disminuir costos en la alimentación de su hato, mejorando sus ingresos y haciendo su producción sostenible.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

- Caracterizar y seleccionar un inóculo de bacterias ácido lácticas proveniente de silo de avena, para mejorar parámetros nutricionales y fermentativos en microsilos de avena.

### ***Objetivos Específicos***

- Aislar, seleccionar, purificar y cuantificar grupos de bacterias ácido lácticas presentes en un silo de avena.

- Evaluar el efecto de un inóculo bacteriano sobre la calidad nutricional de microsilos de avena.
- Determinar el efecto de las bacterias ácido lácticas sobre el proceso fermentativo de ensilaje de avena.

## Capítulo II

### Revisión de Literatura

#### *Conservación de Forrajes*

Dentro de la alimentación animal la conservación de forrajes permite el almacenado en tiempos de abundante producción, conservando la calidad y palatabilidad, lo cual posteriormente facilita disponer de forraje en buenas condiciones nutricionales durante la época de escasas. (Soto, 2010)

Ningún método de conservación de forrajes aumenta la calidad del alimento, con excepción de los forrajes henificados los cuales presentan un aumento del consumo de materia seca, esto dependiendo de la edad de la planta ya que existe una relación inversa con la calidad del forraje (nutrientes digestibles), estos disminuyen si la planta sigue madurando. (Jiménez, Rodríguez, & González, 2005)

#### *Ensilaje*

El ensilaje es un método de conservación de forrajes con alto contenido de humedad, que se fundamenta en la fermentación ácido-láctica espontánea del forraje bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias ácido-lácticas (BAL), propias del material a ensilar, fermentan los carbohidratos solubles a ácidos orgánicos principalmente ácido láctico (Weinberg, 1996). La generación de ácidos orgánicos provoca que el pH del forraje ensilado baje a un nivel capaz de inhibir a microorganismo causantes de putrefacción. (Flores, Sánchez, Gutiérrez, & Echavarría, 2014)

El valor nutritivo y fermentativo de un ensilaje depende de tres factores importantes: Material vegetal a ensilar, grado de humedad del forraje y agotamiento de oxígeno dentro del silo (compactación). (Wilkinson, Bolsen, & Lin, 2003)

**Proceso Fermentativo.**

El proceso de ensilaje se puede dividir en cuatro fases:

***Fase 1 (Aeróbica).***

De corta duración, el aire (oxígeno) todavía está presente entre las partículas de la planta y el valor de pH es de 6,0 – 6,5 (rango normal del jugo de los forrajes frescos). Estas condiciones permiten la continuación de la respiración del material ensilado, que ciertas enzimas como las proteasas y carboxilasas permanezcan activas y que la actividad de microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos (hongos y levaduras) continúe. (Weinberg, 1996)

Es fundamental que las condiciones anaeróbicas del ensilaje sean logradas rápidamente para que la actividad de los procesos que requieren oxígeno se detengan. (Tobía, Uribe, Villalobos, Soto, & Ferris, 2003)

***Fase 2 (Fermentativa).***

Esta fase tiene una duración de varios días a semanas después de que el ensilado se vuelve anaeróbico, la duración depende de las características del forraje ensilado y de las condiciones en el momento del ensilaje. Si la fermentación se desarrolla con éxito, las bacterias ácido-lácticas se desarrollan y se convierten en la población microbiana predominante. Se produce ácido láctico y otros ácidos y el pH disminuye a 3,8 – 5,0. (Flores, Sánchez, Gutiérrez, & Echavarría, 2014)

***Fase 3 (Estable).***

Es una fase relativamente corta, ocurren pocos cambios si se impide el ingreso de oxígeno al silo. Algunos microorganismos ácido-tolerantes sobreviven en este período a niveles de baja actividad y otros como Clostridium y Bacillus sobreviven como esporas (Tobía & Vargas, 2000).

#### ***Fase 4 (Deterioro Aeróbico).***

Comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. El inicio del deterioro es debido a la degradación por levaduras y ocasionalmente por bacterias ácido-acéticas de ácidos orgánicos preservadores. Este periodo 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, que provoca un aumento en el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro, en la que, la temperatura aumenta y favorece la proliferación de microorganismos que deterioran el ensilaje. (Flores, Sánchez, Gutiérrez, & Echavarría, 2014)

La tasa de deterioro depende de la concentración y de la actividad de los organismos que causan estas pérdidas de calidad en el ensilaje. Las mermas por deterioro pueden oscilar entre 1,5 y 4,5 por ciento de materia seca. (Honig & Woolford, 1980)

#### ***Uso de Aditivos en la Elaboración de Ensilajes***

El empleo de aditivos tiene como fin contribuir a la creación de condiciones óptimas que permitan mejorar la conservación y el valor nutritivo del material ensilado. (Dumont, 2006)

Los aditivos para ser usados deben cumplir las siguientes características: a) que sea fácil y seguro de manejar, b) que reduzca las pérdidas de materia seca, c) que mejore la calidad higiénica del ensilado inhibiendo el desarrollo de microorganismos indeseables, d) que limite las fermentaciones secundarias, e) que potencie la estabilidad una vez abierto el silo, f) que incremente el valor nutritivo con una mejora en la eficiencia de utilización. (Soto, 2010)

Los aditivos pueden agruparse en cuatro categorías: estimulantes de la fermentación (enzimas, cultivos microbianos y substratos), inhibidores de la fermentación (esterilizantes directos e indirectos y acidificantes directos), absorbentes (naturales y

sintéticos) y los inhibidores de la descomposición anaeróbica. (Flores, Sánchez, Gutiérrez, & Echavarría, 2014)

### ***Inóculos Microbianos***

Son preparaciones comerciales que contienen una gran concentración de microorganismos, siendo las bacterias ácido-lácticas (BAL) las de mayor uso, ya que incrementan la población natural de BAL en los forrajes, ayudando a que se desarrolle con mayor rapidez y eficiencia la fermentación dentro del silo (Tobía & Vargas, 2000). Su principal función es la estimulación de la fermentación y evitar un rápido deterioro aeróbico.

Los inóculos bacterianos promueven una rápida y eficiente fermentación de los materiales ensilados, lo cual incrementa la calidad y cantidad del producto ensilado (incremento en la recuperación de la materia seca. Estos aditivos presentan algunas ventajas sobre los otros tipos de aditivos, incluyendo su bajo costo, seguridad en su manejo, baja tasa de aplicación por tonelada de forraje picado y no contaminan el ambiente. (Bolsen, 2005).

La fermentación del ensilaje ocurre naturalmente bajo condiciones anaeróbicas debido a la población natural de bacterias en el forraje, pero su velocidad y eficiencia para disminuir el pH es variable ya que dependerá del número y tipo de bacterias productoras de ácido láctico presentes en el cultivo. (Contreras & Muck, 2006)

La microflora natural presente en los ensilados puede ser dividida en dos grandes grupos: microorganismos deseables e indeseables. Las bacterias epifitas productoras de ácido láctico (BAL naturales), constituyen el grupo de microorganismos deseables ya que están presentes naturalmente en el alimento a ensilar, mientras que las indeseables son las que producen deterioro anaeróbico (*Clostridium* y *Enterobacterias*) o bien deterioro aeróbico (levaduras, *Bacillus*, *Listeria* y hongos). La presencia de estos microorganismos disminuye el

valor nutricional de los ensilajes que al ser ingeridos por los animales podrían afectar su salud y por ende su producción (carne – leche). (Flores, Sánchez, Gutiérrez, & Echavarría, 2014)

### ***Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)***

Comprenden un grupo heterogéneo de microorganismos cuya principal característica es la producción de ácido láctico, por lo que estas bacterias que realizan el proceso de fermentación requieren de azúcares para conseguir acidificar el forraje. Las plantas forrajeras deben contener un porcentaje de azúcares de alrededor de 3 a 5 %, para estimular este proceso. (Dumont, 2006)

Las BAL que son regularmente asociadas al ensilaje son miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Su temperatura óptima de crecimiento se ubica entre 25 y 40 °C. (Oude, Driehuis, Gottschal, & Spoelstra, 1999)

De acuerdo a la capacidad de fermentación de azúcares solubles presentes en las plantas, las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden clasificarse como: homofermentativas y heterofermentativa. (Yitbarek & Tamir, 2014)

#### **Homofermentativas.**

(*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus spp.*, y *Enterococcus spp.*), son microorganismos que producen más del 85% de ácido láctico a partir de hexosas (glucosa). No pueden degradar pentosas (xilosa). (Tobía & Vargas, 2000)

#### **Heterofermentativas.**

(*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus pentosus*, y *Enterococcus spp.*): Este tipo de bacterias producen principalmente ácido láctico a partir de hexosas y degradan algunas pentosas, para producir ácido láctico, ácido acético o etanol y CO<sub>2</sub>. (Tobía & Vargas, 2000)

**Tabla 1**

*Reacciones de fermentación producidas por bacterias ácido-lácticas.*

<b>Tipo de Fermentación</b>	<b>Reacción</b>
<b>Homofementativa</b>	1 azúcar (6-C) → 2 ácido láctico
<b>Heterofermentativa</b>	1 azúcar (6-C) → 1 ácido láctico + 1 ácido acético + CO <sub>2</sub>
	1 azúcar (6-C) → 1 ácido láctico + 1 etanol + CO <sub>2</sub>
	1 azúcar (6-C) → ácido láctico → 1 ácido acético + CO <sub>2</sub>

*Nota:* (Muck, 2008).

#### **Efecto de las Bacterias Acido Lácticas Homo Fermentativas Sobre el Ensilaje.**

Los inoculantes bacterianos más comunes encontrados en el mercado están conformados por BAL homo fermentativas, el objetivo principal de usar esto inóculos es preservar la calidad de las plantas ensiladas lo más cerca posible a su estado original. Estas bacterias logran este objetivo a través del descenso del pH, reduciendo las pérdidas de materia seca a un nivel mínimo de 2 o 3%, disminuyen la desnaturalización de proteínas y formación de amoníaco, y aumentan los niveles de ácido láctico y la digestibilidad de la materia seca. (Contreras & Muck, 2006)

La rápida disminución del pH inhibe el crecimiento de bacterias (clostridiales) productoras de ácido butírico que es un indicador de una mala fermentación.

#### **Efecto de las Bacterias Acido Lácticas Heterofermentativas Sobre el Ensilaje.**

El objetivo de este tipo de inoculantes heterofermentativos es mejorar la estabilidad aeróbica (la presencia de oxígeno) a través de la reducción del nivel de levaduras presentes en el ensilaje ya que un alto nivel de éstas provoca un aumento de la temperatura dentro del silo. (Contreras, Marsalis, & Lauriault, 2009)

*Lactobacillus buchneri* es la principal bacteria ácido láctica heterofermentativa usada en cultivos forrajeros en U.S.A. (Muck, 2008)

En investigaciones recientes se han descubierto que algunas BAL heterofermentativas como: *L. buchneri*, *L. reuteri*, *L. crispatus* y *L. brevis*, producen una enzima llamada ferulate esterasa la misma que aumenta la degradación de la pared celular, permitiendo que exista mayor cantidad de carbohidratos solubles para el proceso fermentativo o para uso de las bacterias presentes en el rumen; la ventaja de estas BAL es que además de que mejoran la estabilidad aeróbica pueden aumentar la digestibilidad del ensilaje y potencialmente el desempeño animal. (Nsereko, et al., 2008)

### ***Evaluación de la Calidad de los Ensilajes***

#### **Indicadores Físico – Químicos.**

Dentro de estos indicadores se encuentran el pH, la cantidad de ácidos orgánicos volátiles (láctico, acético y butírico) así como relaciones entre ellos, pérdidas de material ensilado (putrefacción) y la cantidad de nitrógeno amoniacal producido. (Tobía & Vargas, 2000)

#### **Tabla 2**

*Indicadores físico – químicos para valoración de la calidad fermentativa de ensilajes.*

<b>Indicadores</b>	<b>Niveles</b>
<b>Perdida de MS (%)</b>	6 – 8 %
<b>Ph</b>	3,9 – 4,2
<b>Ácido láctico (% MS)</b>	5 – 10 %
<b>Ácido acético (% MS)</b>	< 1,8 óptimo > 6,0 pésimo
<b>Ácido butírico</b>	< 0,1 óptimo > 2,0 pésimo
<b>NH3 / NT</b>	< 7,0 óptimo > 20,0 pésimo

*Nota:* MS: Materia seca. NH3 / NT: Nitrógeno amoniacal como % del nitrógeno total. (Tobía & Vargas, 2000)

### Indicadores Organolépticos.

Son una herramienta para realizar una evaluación subjetiva de la calidad de un ensilaje. Los parámetros considerados en orden de importancia son: olor, color y textura. Su exactitud dependerá de la experiencia del evaluador. (Tobía & Vargas, 2000)

Por no requerirse de mediciones para su ejecución, se ha convertido en la alternativa de evaluación más utilizada, económica y práctica.

**Tabla 3**

*Indicadores organolépticos para evaluación sensorial de un ensilaje*

Indicador	Clasificación			
	Excelente	Bueno	Regular	Malo
<b>Olor</b>	Agradable, a fruta madura	Agradable con ligero olor a vinagre	Ácido con fuerte olor a vinagre	Desagradable putrefacto, rancio, permanece pegado en las manos
<b>Color</b>	Verde aceituno	Verde amarillento	Verde oscuro	Carmelita casi negro
<b>Textura</b>	Conserva sus contornos, las hojas permanecen unidas a los tallos	Conserva sus contornos, las hojas permanecen unidas a los tallos	Las hojas se separan fácilmente de los tallos	No hay diferencia entre las hojas y los tallos, forma masa

*Nota:* (Tobía & Vargas, 2000)

### **Ventajas y Desventajas del Ensilaje**

Dentro de las principales ventajas se tienen las siguientes:

- Se puede almacenar alimentos que no pueden ser sometidos a henificación debido a su alto contenido de humedad.
- Los recursos forrajeros o materias primas se pueden almacenar por periodos prolongados, sin mayores cambios en su composición y calidad nutricional.

- Se puede aprovechar los excedentes de forrajes producidos en determinadas épocas del año, con lo que se intensifica la producción de pasto y permite aumentar la carga animal por hectárea.
- Permite disponer de alimento durante todo el año, principalmente durante las épocas de escasez.
- Disminuye la pérdida de componentes botánicos de la planta (hojas y tallos) que no son aprovechados en otros métodos de conservación.

Las desventajas del ensilaje se ven marcadas en las inversiones que se requieren para su construcción a gran escala en cuanto a maquinaria y a equipos a usarse para la compactación y el adecuado almacenamiento para evitar la descomposición del forraje. (Valencia, Hernández, & López, 2011)

## Capítulo III

### **Materiales y Métodos**

#### ***Ubicación del Lugar de la Investigación***

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de: Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas y en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Biología, ambas dependencias pertenecientes a la Universidad Central del Ecuador.

#### ***Ubicación Política***

Provincia: Pichincha

Cantón: Quito

Parroquia: Belisario Quevedo

Laboratorios:

- 1) Laboratorio de Nutrición Animal (Facultad de Ciencias Agrícolas)
- 2) Laboratorio de Microbiología (Centro de Biología)

#### ***Ubicación Geográfica***

Altitud: 2800 msnm

Latitud: 00°21'15"S

Longitud: 78°32'47"O

### ***Materiales y Equipos***

#### **Aislamiento de Bacterias Acido-Lácticas Epífitas.**

##### ***Materiales y Equipos de Campo.***

- Tubos PVC de 4 pulgadas (Altura 30 cm, diámetro 11 cm, volumen 2850,9 cm<sup>3</sup>)
- Rollo de cinta Stretch Film
- Rollo de cinta para ductos

- Recipiente para dilución de melaza
- Marcador permanente
- Libreta de campo
- Balanza
- Jeringuillas de 20 ml
- 25 ml de Melaza
- Material vegetal utilizado: 5 kilogramos de Avena forrajera (*Avena sativa*)

***Materiales y Equipos de Laboratorio.***

- Cajas mono petri descartables
- Matraz Erlenmeyer 125 ml
- Asas bacteriológicas
- Tubos de ensayo 16 x 150 mm
- Jeringuillas de insulina de 1ml
- Portaobjetos
- Lámpara de alcohol
- Balanza analítica
- Jarra de anaerobiosis (Gas Pak)
- Incubadora
- Contador de colonias
- Autoclave

Reactivos:

- Medio de cultivo MRS Agar
- Agua peptonada bufferada estéril
- Peróxido de hidrógeno

- Reactivos para Tinción Gram
- Reactivos para Prueba O-F (Oxido fermentativa o de Hugh-Leifson)
- Reactivos para Prueba de fermentación de azúcares (Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato)
- Aceite mineral

### **Implementación de Tratamientos y Evaluación Nutricional y Fermentativa de Microsilos.**

#### ***Materiales de Campo.***

- 135 tubos plásticos - PVC de 4 pulgadas (Altura 30 cm, diámetro 7,5 cm, volumen 1325,35 cm<sup>3</sup>)
- Rollo de cinta Strech Film
- Rollo de cinta para ductos
- Recipiente para dilución de melaza
- Marcadores permanentes
- Libreta de campo
- Balanza
- Jeringuillas de 20 ml
- 425 ml de Melaza
- Material vegetal utilizado: 85 kilogramos de Avena forrajera (*Avena sativa*)

#### ***Equipos de Campo.***

- Picadora de pasto
- Balanza digital de 50 kilogramos

#### ***Materiales de Laboratorio.***

- Vasos de Precipitación de (150 ml, 100 ml y 50 ml)
- Vasos plásticos de 2 onzas

- Matraz de 125 ml
- Tubos de Kjeldahl 250 ml
- Bureta digital - Titrette®, 25 ml
- Pipeta Pipet-Lite™ XLS - Mettler Toledo, 0.5-5.0 ml
- Pipeta Pipet-Lite™ XLS - Mettler Toledo, 1.0-10.0 ml
- Crisoles de vidrio porosos p2
- Varilla de agitación
- Guantes de examinación
- Bandejas plásticas
- Tijera de podar
- Marcadores
- Papel absorbente

***Equipos de Laboratorio.***

- Balanza analítica marca Mettler Toledo MS204
- Balanza Automática de plataforma marca August
- Balanza de precisión marca Santourius 2204
- Termómetro digital tipo Lápiz
- Potenciómetro marca Horiba modelo F-74G
- Mufla marca Cress C1232
- Estufa marca Memert grande
- Estufa marca Memert TV30U
- Extractor de Fibra y celulosa marca Selecta 4000623
- Unidad de digestión macro Kjeldahl de 12 puestos marca Selecta
- Destilador Kjeldahl marca selecta Pro-Nitro
- Dispensador de líquidos Thomas scientific, 5-30 ml

- Campana extractora de gases marca Sematech
- Plancha de calentamiento y agitación magnética marca Thermo Cientific
- Destilador de agua marca Barnstead

**Reactivos.**

- Agua Destilada
- Hidróxido de Sodio 1N
- Reactivos para determinación de FDN (Lauril sulfato de sodio, 2-Etoxietanol p.a., Etilen diamino tetracético, Tetraborato Sódico decahidratado, Fosfato Disódico anhídrido).
- Reactivos para determinación de FDA (Bromuro de cetil trimetil amonio, Solución de ácido sulfúrico 1N).
- Reactivos para método de Kjeldahl (Ácido Sulfúrico concentrado, Ácido Bórico, Verde de bromocresol 0,1%, Rojo de metilo 0,1%).
- Pastillas Kjeldahl

**Métodos**

**Factores en Estudio.**

El factor en estudio fue el efecto de diferentes concentraciones (UFC) de bacterias ácido – lácticas (propias de silo de avena), sobre la calidad nutricional y fermentativa de microsilos de avena.

**Diseño Experimental.**

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con cinco tratamientos, de los cuales uno fue el testigo absoluto, en cada tratamiento se realizó tres repeticiones para la obtención de la media. Además, se realizó un análisis estadístico de correlación entre los tratamientos para la obtención de las curvas de variación de las variables: temperatura, pH y

acidez (% de ácido láctico) con nueve puntos de muestreo desde el día 2 hasta el día 40 de experimentación; mientras que para las variables nutricionales (PC, FDN y FDA) se realizaron histogramas para comparar sus variaciones al principio y al final del proceso fermentativo.

#### **Tratamientos en Estudio.**

Se elaboró una mezcla de 85 ml de mezcla de agua y melaza en partes iguales luego se inocularon con 10 ml de los diferentes tratamientos. Esta preparación se homogenizó con 17 kilogramos de forraje previamente picado. Finalmente se elaboraron microsilos con tubos PVC.

Los tratamientos propuestos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Tratamientos propuestos para este estudio*

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
<b>T0</b>	17 kg de pasto picado más aditivo agua – melaza en partes iguales. Testigo absoluto sin inóculo bacteriano.
<b>T1</b>	17 kg de pasto más aditivo agua – melaza en partes iguales. A este tratamiento se le adicionó un inóculo de BAL a una concentración de $0,5 \times 10^6$ UFC/ml (mitad de la concentración recomendada).
<b>T2</b>	17 kg de pasto más aditivo agua – melaza en partes iguales. A este tratamiento se le adicionó un inóculo de BAL a una concentración de $1 \times 10^6$ UFC/ml (concentración recomendada).
<b>T3</b>	17 kg de pasto más aditivo agua – melaza en partes iguales. A este tratamiento se le adicionó un inóculo de BAL a una concentración de $2 \times 10^6$ UFC/ml (doble de la concentración recomendada).
<b>T4</b>	17 kg de pasto más aditivo agua – melaza en partes iguales. A este tratamiento se le adicionó un inóculo de BAL a una concentración de $3 \times 10^6$ UFC/ml (tres veces más de la concentración recomendada).

#### **Características de las unidades experimentales.**

La unidad experimental fue un microsililo de PVC, con las siguientes características:

**Tabla 5***Características de las unidades experimentales*

<b>Microsilos</b>	
<b>Altura</b>	30 cm
<b>Diámetro</b>	75 mm – 7,5 cm
<b>Radio</b>	3,75 cm
<b>Volumen</b>	1325,35 cm <sup>3</sup>
<b>Tipo de material</b>	Plástico – tubo PVC

**Características de los Grupos Experimentales.**

Se elaboraron unidades experimentales para cada tratamiento (5), repetición (3) y tiempo de fermentación (9): 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 30 y 40 días. En total fueron 135 microsilos.

Se decidió utilizar el método de microsilos ya que este método permite valorar cada tiempo de incubación sin afectar los otros tiempos propuestos.

**Tabla 6***Caracterización de los grupos experimentales*

<b>Unidad experimental</b>	<b>Microsilos</b>
<b>Nº de unidades experimentales</b>	135
<b>Nº de unidades experimentales por tratamiento</b>	27
<b>Pasto por tratamiento</b>	17 kg
<b>Numero de tratamientos</b>	5
<b>Número de repeticiones</b>	3

**Identificación de Tratamientos.**

Una vez que fueron cortados los tubos PVC, se identificó con marcador permanente cada unidad experimental; para cada tratamiento se asignó la letra mayúscula T seguida del número de tratamiento (T0, T1, T2, T3, T4) y cada repetición con la letra mayúscula R seguida del número de repetición (R1, R2, R3).

### **Análisis Funcional.**

Todos los datos fueron evaluados estadísticamente con análisis de Varianza (ADEVA), para las variables con diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) se realizó la prueba de Tukey al 5% para establecer la diferencia entre sus medias.

### **Esquema del Análisis de Varianza del Experimento.**

**Tabla 7**

*Esquema de ADEVA por cada tratamiento*

<b>Fuentes de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
<b>Total</b>	14
<b>Tratamientos</b>	5
<b>Repeticiones</b>	3
<b>Error Experimental</b>	10

### **Métodos Específicos del Manejo del Experimento.**

La investigación fue dividida en dos fases: una para el aislamiento e identificación de bacterias ácido-lácticas presentes en un silo de avena y la otra consistió en el armado de microsilos de avena con la adición de un inóculo de BAL en diferentes concentraciones, para posterior evaluación nutricional y fermentativa.

#### ***Aislamiento de Bacterias.***

Se realizó por el método de aislamiento en placa por diluciones sucesivas.

Se utilizó una muestra de 5 kilogramos de Avena forrajera (Avena sativa), para la simulación del proceso fermentativo y posterior aislamiento de BAL epífitas.

El pasto se preparó mediante picado en partículas de aproximadamente 0,8 a 2 cm para el ensilaje y se transportó al laboratorio de Microbiología del Centro de Biología en fundas ziplock para excluir el aire.

Para el aislamiento de bacterias ácido – lácticas, se utilizó como unidad experimental un tubo plástico (PVC) de 11 cm de diámetro y una altura de 30 cm, en el que se compactó aproximadamente 1,5 kilogramos de pasto picado, este procedimiento fue repetido en 3 tubos PVC con las mismas características; fueron identificados con letras (A, B, C) y se sellaron completamente a menara de tres capaz con plástico film, cinta para ductos metálica y cinta de embalaje para crear un ambiente completamente anaeróbico, se dejó reposar a temperatura ambiental.

Transcurrido 40 días del proceso fermentativo se destaparon los microsilos en condiciones de esterilidad y en cada microsilo se evaluaron las características sensoriales: olor, color y textura. En base a las características y aspectos de calidad encontrados se clasificaron los microsilos como excelente, bueno, regular o malo.

**Tabla 8**

*Clasificación de indicadores sensoriales de un ensilaje*

Indicador	Clasificación			
	Excelente	Bueno	Regular	Malo
<b>Olor</b>	Agradable, a fruta madura	Agradable con ligero olor a vinagre	Ácido con fuerte olor a vinagre	Desagradable putrefacto, rancio, permanece pegado en las manos
<b>Color</b>	Verde aceituno	Verde amarillento	Verde oscuro	Carmelita casi negro
<b>Textura</b>	Conserva sus contornos, las hojas permanecen unidas a los tallos	Conserva sus contornos, las hojas permanecen unidas a los tallos	Las hojas se separan fácilmente de los tallos	No hay diferencia entre las hojas y los tallos, forma masa

Los microsilos considerados como excelentes luego de 40 días de fermentación fueron seleccionados y su contenido fue mezclado para posteriormente tomar una muestra de 10 gramos la cuál fue depositada en un matraz de vidrio que contenía 90 ml de agua peptonada buferada estéril 1% (P/V) se homogenizo esta mezcla y seguidamente se

realizaron diluciones seriadas (10-8, 10-7, 10-6, 10-5) tomando 1 ml de la solución madre (agua peptonada buferada más muestra de silo) y depositando en tubos de ensayo con solución salina estéril. De estas diluciones se tomó una alícuota de 0,1 ml y se colocó en cajas Petri con medio de cultivo Agar De Man-Rogosa y Sharpe (MRS, selectivo para BAL) y se realizó una extensión en la placa, para facilitar el recuento de colonias de bacterias. (Camacho, et al., 2009)

Las cajas Petri en posición invertida se incubaron durante 48 horas a 30 °C bajo una atmosfera anaerobia mediante una jarra Gaspak (10% CO<sub>2</sub>), luego de este tiempo se realizó el contaje de las unidades formadoras de colonia en cada caja, se identificaron las colonias con características de BAL con apariencia redondeada regular, bordes definidos y colonias blancas o blanco-amarillentas y se aislaron en nuevas cajas Petri para incubarse nuevamente.

#### ***Identificación de BAL.***

Después de tres subcultivos se realizó la identificación de colonias de BAL, a través de las siguientes tinciones y pruebas bioquímicas: Tinción Gram – Prueba Catalasa Oxidasa– Pruebas Bioquímicas (Fermentación de azúcares) – Prueba de Oxidación Fermentación (O/F) – TSI – SIM – Simons Citrato.

Las reacciones observadas en estas pruebas bioquímicas del metabolismo bacteriano fueron interpretadas como positivas o negativas.

#### ***Conservación de Bacterias Aisladas.***

Para la conservación de cada una de las cepas identificadas, se inoculó en tubos de cepas con tapón de baquelita conteniendo agar MRS, se incubaron durante 48 horas y posteriormente se selló con aceite mineral al 10% estéril, finalmente se colocaron los tubos en refrigeración a 5 °C. (Tobía, Uribe, Villalobos, Soto, & Ferris, 2003)

### ***Obtención de Forraje para Microsilos.***

Para esta investigación se usó una muestra de avena forrajera (*Avena sativa*) en una cantidad de 17 kilogramos para cada tratamiento, el criterio para la selección del forraje fue que sean de la misma variedad y estado vegetativo (Grano lechoso pastoso – hojas volcadas). (Piñeiro, 2010)

El material vegetal fue picado en partículas de aproximadamente 0,8 a 2 cm con la ayuda de una picadora de pasto a motor y transportado en fundas herméticas al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agrícolas.

### ***Preparación de Tratamientos.***

Se pesó 17 kilogramos del forraje picado y se mezcló de manera homogénea con las UFC de bacterias ácido – lácticas definidas para cada tratamiento (T0, T1, T2, T3, T4), seguidamente se inició con la compactación de esta mezcla en tubos PVC tratando de que la presión excluya la mayor cantidad de aire posible y se sellaron completamente a menara de tres capas con plástico film, cinta para ductos metálica y cinta de embalaje para crear un ambiente totalmente anaerobio, se identificaron cada uno de los tratamientos con sus repeticiones y se mantuvieron a temperatura ambiental para posterior muestreo durante 40 días de proceso fermentativo (ensilaje).

### ***Variables en Estudio***

#### **Parámetros de Calidad Fermentativa.**

##### ***Temperatura.***

Se tomó la temperatura interna de cada microsilos, mediante un termómetro digital introduciendo su punta tipo lápiz por un orificio a cada extremo del tubo para evitar errores. Estos datos fueron tomados en un punto inicial (día de picado de pasto) y posteriormente hasta obtener los 9 puntos planteados en el estudio.

***pH (Potencial Hidrógeno).***

Esta variable fue determinada con el uso de un potenciómetro, su electrodo de mercurio muestra lecturas de potencial de hidrógeno únicamente en estado líquido, por lo que el ensilaje se tuvo que mezclar con una fase líquida, pesando 25 gramos de ensilaje y mezclando con 50 ml de agua destilada y se dejó reposar por 30 minutos, luego de este tiempo se filtró la mezcla en un vaso plástico de 2 onzas y se realizó la medición del pH. Estos datos fueron tomados hasta obtener los 9 puntos planteados en el estudio, incluyendo un punto inicial (día de picado de pasto).

**Porcentaje de Ácido Láctico (Acidez Titulable)**

Se determinó por el método de acidez titulable el cual muestra la concentración de ácidos orgánicos presentes en una muestra, a través del consumo de Hidróxido de sodio (NaOH) que actúa como base en el proceso de titulación.

La medición de esta variable se realizó en nueve puntos de muestreo a los 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 30 y 40 días, evaluando en cada punto 15 microsilos (3 por cada tratamiento) y dos submuestras por cada microsilo.

Luego de determinar el pH de la muestra, se tomó una alícuota de 5ml del filtrado (ensilaje más agua destilada), se colocó en un vaso plástico de 2 onzas y se añadió 10 ml de agua destilada, esta solución se colocó en un agitador magnético para mantener una agitación continua; para iniciar con la titulación se introdujo el potenciómetro en el interior del vaso, verificando que esté en contacto con la solución y comprobando la medición del pH; seguidamente se dejó caer la base (NaOH) gota a gota directamente desde la bureta hasta que el rango de pH llegue a 8,3 ya que este valor es el rango de saturación de la base (NaOH).

La normalidad de la base fue determinada colocando 10 ml de NaOH en tres matraces erlenmeyer de 50 ml y se añadió 10 gotas de fenolftaleína tornándose la muestra de color rosado, seguidamente se tituló con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) hasta que la solución retorne a su color inicial (transparente), el valor consumido del ácido se aplicó para el cálculo a través de la siguiente fórmula:

$$NB = \frac{NA \times VA}{VB}$$

*Dónde:*

NA: Normalidad del ácido (constante 0,0478)

VA: Volumen del ácido (consumo en la saturación del ácido sulfúrico)

VB: Volumen de la base (10ml de NaOH colocado en el matraz)

Una vez calculada la normalidad del primer matraz se realizó el mismo procedimiento con los matraces restantes. La determinación final de la normalidad de la base (NaOH) se obtuvo a través del promedio de los tres matraces.

El porcentaje de ácido láctico se calculó tomando como referencia el punto inicial del hidróxido de sodio, marcado en la bureta graduada antes de iniciar la titulación y el punto final cuando el valor del pH de cada muestra es de 8,3, la diferencia de estos dos valores da como resultado el volumen consumido de la base, con los valores obtenidos se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ÁCIDO LÁCTICO} = \left( \frac{NB \times VB \times MA}{\text{Alícuota} \times PM} \right) \times 100$$

*Donde:*

NB: Normalidad de la base (Calculado con el método de fenolftaleína)

VB: Volumen de la base (Consumo de NaOH de cada muestra)

MA: Peso molecular del ácido láctico (90,08 constante)

Alícuota: 5 ml del extracto de ensilaje

PM: Peso de la muestra (25 gramos de ensilaje).

### **Índices de Calidad Nutricional.**

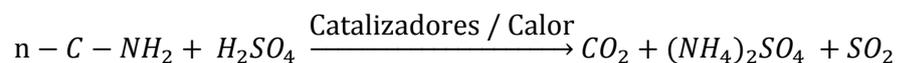
Los datos de PB, FDN, FDA y MS, fueron tomados de la muestra de pasto Avena pre ensilado (forraje picado) y post ensilado (después de 40 días) de cada uno de los tratamientos. En el análisis de los datos se compararon los valores obtenidos del forraje picado antes del ensilado versus los tratamientos post ensilado.

### ***Proteína Bruta (PB.)***

El contenido de proteína cruda del pasto se determinó por el método Kjeldahl que es oficial y aprobado por la AOAC 2001.11, el cual determina el contenido total de nitrógeno de un alimento. Se asume con este método, que todo el nitrógeno es de origen proteico, sin considerar que existe una proporción de N asociado a otros compuestos como las amidas, urea, lignina, etc.

Este método de determinación de proteína tiene tres etapas: digestión o mineralización, destilación y titulación con ácido sulfúrico. Luego de ello se calculó el porcentaje de nitrógeno y a partir de este el porcentaje de proteína.

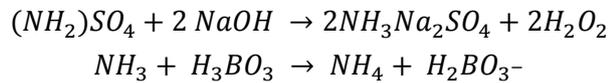
- 1) Etapa de digestión: tratamiento de la muestra con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición convierte el nitrógeno orgánico en ion amonio.



En esta etapa, el nitrógeno proteico es transformado en sulfato de amonio por acción del ácido sulfúrico, para llevar a cabo este procedimiento se utilizó un digestor automático el cual digiere la muestra hasta llegar a una temperatura de 420 °C. Cuando la

muestra toma un color verde esmeralda es indicador de que el proceso de digestión ha terminado. (García & Fernández, 2012)

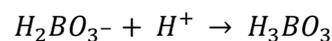
2) Etapa de destilación: la muestra digerida es alcalinizada y el nitrógeno se desprende en forma de amoníaco y este se recoge sobre un exceso desconocido de ácido bórico.



Para esta etapa se utilizó una unidad automática de destilación que adiciona agua destilada e incorpora automáticamente una solución de hidróxido de sodio 10 N. El amoníaco liberado es arrastrado por vapor de agua hacia un matraz que contiene ácido bórico al 4%. (García & Fernández, 2012)

3) Etapa de titulación o valoración

La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realizó por medio de una determinación volumétrica ácido – base del ion borato. Para esto se utilizó ácido sulfúrico y como indicador una disolución alcohólica de rojo de metilo.



Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoníaco destilados. (García & Fernández, 2012)

4) Cálculos

A partir de la titulación se calcula el número de equivalentes de nitrógeno recogidos, para obtener el porcentaje de nitrógeno presente en la muestra. La determinación del porcentaje de proteína se realizó aplicando la siguiente fórmula.

$$\%Proteína = \%N \times (6,25)$$

*Donde:*

%N: Porcentaje de nitrógeno

6,25: Factor de conversión

***Fibra Detergente Neutro (FDN)***

La fibra detergente neutro (FDN) es la porción de fibra que queda luego de someter a la muestra a ebullición en una solución de detergente neutro; es la fracción del forraje que corresponde a las paredes celulares y está asociada negativamente con la ingestión de materia seca y se incrementa con el estado de madurez de los forrajes.

Esta variable se determinó por el método de crisol aprobado por laAOAC 2002:04, de acuerdo con la técnica descrita por Goering y Van Soest (1970), en la que se utiliza un detergente neutro compuesto por: Lauril sulfato de sodio, EDTA, Borato de sodio decahidratado, Fosfato disódico anhídrido y Etoxietanol.

Luego de la digestión, filtración e incineración, se calculó el porcentaje de fibra detergente neutro con la siguiente fórmula:

$$FDN \% = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} * 100$$

Donde:

P<sub>1</sub>: Peso del crisol (g)

P<sub>2</sub>: Peso del crisol con la muestra seca (g)

P<sub>3</sub>: Peso de la muestra

***Fibra Detergente Ácido (FDA)***

Esta variable se determinó por el método de crisol aprobado por laAOAC 973.18

La fibra detergente ácido (FDA) son las porciones de pared celular del forraje que está constituida por celulosa y lignina, es el resultado de someter a las muestras de pasto a una solución de detergente ácido, compuesta por: ácido sulfúrico y bromuro de acetil trimetil amonio, según Goering y Van Soest (1970).

Luego de la digestión, filtración e incineración, se calculó el porcentaje de fibra detergente neutro con la siguiente fórmula:

$$FDA \% = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} * 100$$

Donde:

P<sub>1</sub>: Peso del crisol (g)

P<sub>2</sub>: Peso del crisol con la muestra seca (g)

P<sub>3</sub>: Peso de la muestra

## Capítulo IV

### Resultados y Discusión

La investigación fue dividida en tres fases: En la primera fase se realizó el aislamiento e identificación de bacterias para posterior conformación de un inóculo de bacterias ácido-lácticas propias de un silo de avena; la segunda fase consistió en la aplicación de análisis de varianza (ANOVA) a las variables temperatura, pH y % de ácido láctico, para determinar la significancia estadística entre cada tratamiento y en las variables con diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) se aplicó la Prueba de Tukey; en la tercera fase se realizó una comparación entre el punto inicial y el punto final de las variables nutricionales (Proteína, FDN, FDA).

### ***Bacterias Acido-Lácticas Identificadas***

A partir del ensilaje considerado con características óptimas para el aislamiento, se identificaron colonias bacterianas con características morfológicas típicas de BAL, en las que luego de su aislamiento y subcultivo en MRS agar se realizó una evaluación morfológica y se aplicaron pruebas bioquímicas para su posterior identificación.

Tabla 9

*Características de colonias aisladas en agar MRS*

	<b>ITEMS</b>	<b><i>Pediococcus acidilactici</i></b>	<b><i>Lactobacillus acidophilus</i></b>
<b>Evaluación Macroscópica</b>	Morfología colonias	Colonias pequeñas borde regular	Colonias medianas con halo
	Forma colonias	Redondas	Redondas
	Tamaño colonias	Pequeñas - medianas	Medianas
	Superficie colonias	Lisa	Lisa
	Aspecto	Cremosa	Cremosa
	Color	Crema	Crema
	Elevación	Plana	Plana
	Densidad	Mucoide	Mucoide - Brillante
<b>Tinción y Evaluación Microscópica</b>	Tinción Gram	Gram +	Gram +
	Morfología	Coco (Tetradas)	Bacilo (Alargados)
<b>Características Bioquímicas</b>	Catalasa	Negativo (-)	Negativo (-)
	Oxidasa	Negativo (-)	Negativo (-)
	Triple Sugar Iron Agar (TSI)	A/A	A/A (Gas)
	Agar Citrato de Simmons	Negativo (-)	Negativo (-)
	Indol	Negativo (-)	Negativo (-)
	Movilidad	Negativo (-)	Positivo (+)
	Sulfuro	Negativo (-)	Negativo (-)
	Oxidación	Negativo (-)	Negativo (-)
	Fermentación	Positivo (+)	Positivo (+)
	<b>Características fisiológicas</b>	Crecimiento a 37º C.	Positivo (+)
<b>Fermentación de azúcares</b>	L-Arabinosa	Positivo (+)	Positivo (+)
	Galactosa	Positivo (+)	Positivo (+)
	D-Fructosa	Positivo (+)	Positivo (+)
	Lactosa	Positivo (+)	Positivo (+)
	Sacarosa	Positivo (+)	Positivo (+)

### Temperatura.

**Tabla 10**

*Variación de la temperatura (°C) en función de los días de fermentación del ensilaje en cada tratamiento*

Tratamientos	Días de fermentación																	
	2	Sig.	4	Sig.	6	Sig.	8	Sig.	12	Sig.	16	Sig.	20	Sig.	30	Sig.	40	Sig.
<b>T0</b>	18,23	<b>A</b>	17,8	<b>A</b>	17,93	<b>A</b>	18,92	<b>A</b>	18,02	<b>A</b>	18,47	<b>A</b>	18,43	<b>AB</b>	18,3	<b>A</b>	17,82	<b>AB</b>
<b>T1</b>	18,48	<b>A</b>	17,57	<b>A</b>	18,00	<b>A</b>	18,80	<b>A</b>	18,13	<b>A</b>	19,02	<b>B</b>	18,57	<b>B</b>	18,32	<b>A</b>	17,95	<b>ABC</b>
<b>T2</b>	18,2	<b>A</b>	17,73	<b>A</b>	18,12	<b>A</b>	18,85	<b>A</b>	17,93	<b>A</b>	18,40	<b>A</b>	18,65	<b>B</b>	18,05	<b>A</b>	17,63	<b>A</b>
<b>T3</b>	19,02	<b>B</b>	17,83	<b>A</b>	18,22	<b>A</b>	18,95	<b>A</b>	18,05	<b>A</b>	18,72	<b>AB</b>	18,53	<b>B</b>	18,13	<b>A</b>	18,13	<b>BC</b>
<b>T4</b>	19,07	<b>B</b>	17,97	<b>A</b>	18,22	<b>A</b>	19,02	<b>A</b>	18,40	<b>B</b>	18,40	<b>A</b>	18,23	<b>A</b>	18,33	<b>A</b>	18,33	<b>C</b>
<b>X</b>	18,60		17,78		18,10		18,91		18,11		18,60		18,48		18,22		17,97	
<b>CV</b>	0,76		0,858		0,76		0,80		0,42		0,89		0,4		0,98		0,83	

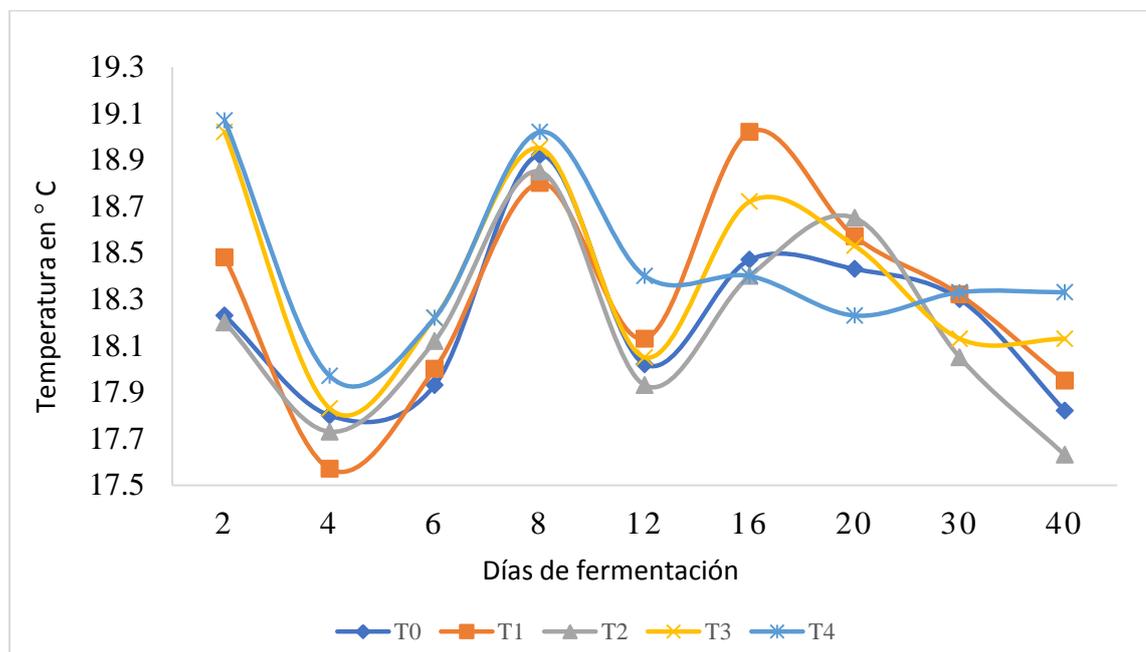
*Nota:* X: Media, CV: Coeficiente de variación, Sig: Significancia

Los valores obtenidos de temperatura en los primeros días de iniciado el proceso fermentativo tuvieron una ligera tendencia a bajar, mientras que, a partir del sexto día ésta empezó a aumentar alcanzando su promedio máximo al octavo día con 18,91°C; en el tratamiento 4 (T4) el valor de la temperatura fue mayor durante todo el proceso fermentativo en comparación con los otros tratamientos.

Con los resultados obtenidos en el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) desde el día 2 hasta el día 12 de fermentación; mientras que en los días 16, 20 y 40 de fermentación existió diferencias significativas entre los tratamientos T0, T1, T2, T3 versus el tratamiento T4, el que mantuvo un valor alto de temperatura 18,33 °C hasta el día 40 de fermentación.

**Figura 1**

*Variación de la temperatura en función de los días de fermentación*



El descenso de la temperatura registrado en los primeros se debería a que durante las primeras horas existe todavía presencia de oxígeno siendo esta la fase aerobia previa a crearse las condiciones anaerobias dentro del ensilaje. Mientras que, el aumento de la

temperatura registrado a partir del día seis podría ser indicativo de que el ambiente interno del ensilaje se ha estabilizado (ambiente completamente anaerobio) y que las bacterias ácido lácticas empiezan a ejercer su actividad microbiológica. (Martinez, Pulido, & Latrille, 2002)

El aumento considerable de la temperatura en los estadios finales del ensilaje, como se observa en el tratamiento 4 ( $3 \times 10^6$  UFC/ ml) provocaría desnaturalización del sustrato existente para el desarrollo de BAL y causa un aumento de microorganismos indeseables. (Campo, Valero, & Gómez, 2015)

El aumento considerable de la temperatura en el tratamiento 4 ( $3 \times 10^6$  UFC/ ml) sería a causa de que al existir una alta concentración de BAL en los primeros días agotan rápidamente todo el sustrato existente.

Meléndez (2016) manifiesta que la temperatura ideal para un buen ensilaje es de 18 – 21° C, que coincide con los parámetros encontrados en esta investigación.

Las variaciones en los rangos de temperatura de los ensilajes en las fases de fermentación dependen del tipo y calidad de forraje y de la técnica usada para la cosecha y ensilaje (Oude et al., 1999); el aumento de la temperatura provoca una disminución de la calidad del ensilaje, ya que se puede dar inicio a reacciones entre los nutrientes produciendo: agua, CO<sub>2</sub> y energía, por lo que, la compactación del forraje y el sellado del silo al momento de iniciar la fermentación es primordial ya que al eliminar completamente el oxígeno se evita que haya respiración y por ende la proliferación de microorganismo anaeróbicos (Favre, 2012), evitando el deterioro temprano de los ensilajes.

**pH (Potencial Hidrógeno).****Tabla 11**

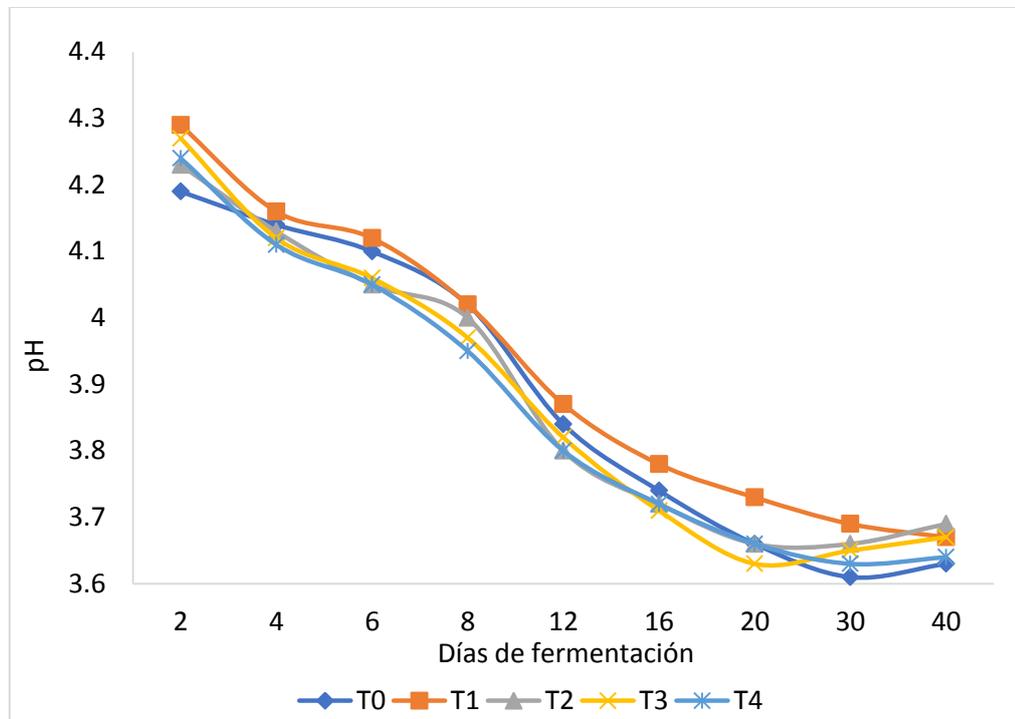
Variación del pH en función de los días de fermentación del ensilaje en cada tratamiento

Tratamientos	Días de fermentación																	
	2	Sig.	4	Sig.	6	Sig.	8	Sig.	12	Sig.	16	Sig.	20	Sig.	30	Sig.	40	Sig.
<b>T0</b>	4,19	<b>A</b>	4,14	<b>A</b>	4,1	<b>A</b>	4,02	<b>AB</b>	3,84	<b>A</b>	3,74	<b>A</b>	3,66	<b>A</b>	3,61	<b>A</b>	3,64	<b>A</b>
<b>T1</b>	4,29	<b>B</b>	4,16	<b>A</b>	4,12	<b>A</b>	4,02	<b>B</b>	3,87	<b>A</b>	3,78	<b>A</b>	3,73	<b>A</b>	3,69	<b>A</b>	3,67	<b>A</b>
<b>T2</b>	4,23	<b>AB</b>	4,13	<b>A</b>	4,05	<b>A</b>	4,00	<b>AB</b>	3,8	<b>A</b>	3,72	<b>A</b>	3,66	<b>A</b>	3,66	<b>A</b>	3,69	<b>A</b>
<b>T3</b>	4,27	<b>AB</b>	4,12	<b>A</b>	4,06	<b>A</b>	3,97	<b>AB</b>	3,82	<b>A</b>	3,71	<b>A</b>	3,63	<b>A</b>	3,65	<b>A</b>	3,67	<b>A</b>
<b>T4</b>	4,24	<b>AB</b>	4,11	<b>A</b>	4,05	<b>A</b>	3,95	<b>A</b>	3,8	<b>A</b>	3,72	<b>A</b>	3,66	<b>A</b>	3,63	<b>A</b>	3,63	<b>A</b>
<b>X</b>	4,24		4,13		4,08		3,99		3,83		3,73		3,67		3,65		3,66	
<b>CV</b>	0,71		0,66		0,76		0,57		0,76		0,78		0,80		0,89		0,83	

*Nota:* X: Media, CV: Coeficiente de variación, Sig: Significancia

**Figura 2**

*Cambios del valor de pH en función de los días de fermentación*



Los niveles de pH en todos los tratamientos tuvieron una tendencia a bajar conforme avanzan los días de fermentación; en el día dos de fermentación se observó que el valor de pH fue más bajo en el testigo (T0) 4,19, mientras que en el tratamiento uno (T1) el valor de pH fue de 4,29, que en comparación con los demás tratamientos es el más alto.

Al aplicar ANOVA a cada uno de los tratamientos se encontró que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos en los días 4, 6, 12, 16, 20, 30 y 40 de fermentación; por lo contrario, en los días 2 y 8 de fermentación existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos: T0 y T1 al segundo día de fermentación y entre T1 y T4 al octavo día de fermentación. Sin embargo, el valor de pH más bajo al finalizar el proceso fermentativo (40 días) fue el que presentó el tratamiento T4 ( $3 \times 10^6$  UFC) seguido por el tratamiento T0 (testigo = 0 UFC).

El nivel de pH de un ensilaje es un indicador usado para determinar el índice de calidad, al estar relacionado con procesos de degradación de los forrajes durante el tiempo de conservación anaeróbica (Rodríguez, 2006). Siendo valores de pH de 3,5 a 4,2 ideales e indicadores de una buena fermentación láctica y a este nivel se inhibe toda actividad bioquímica, quedando en ese momento estabilizada la masa de silo. (Soto, 2010)

Muck et al. (2018) afirma que la adición de bacterias ácido lácticas homofermentativas en los ensilajes de algunas gramíneas presentan un pH más bajo y un alto contenido de ácido láctico en relación con otros productos de la fermentación.

**Porcentaje de Ácido Láctico (Acidez Titulable).**

**Tabla 12**

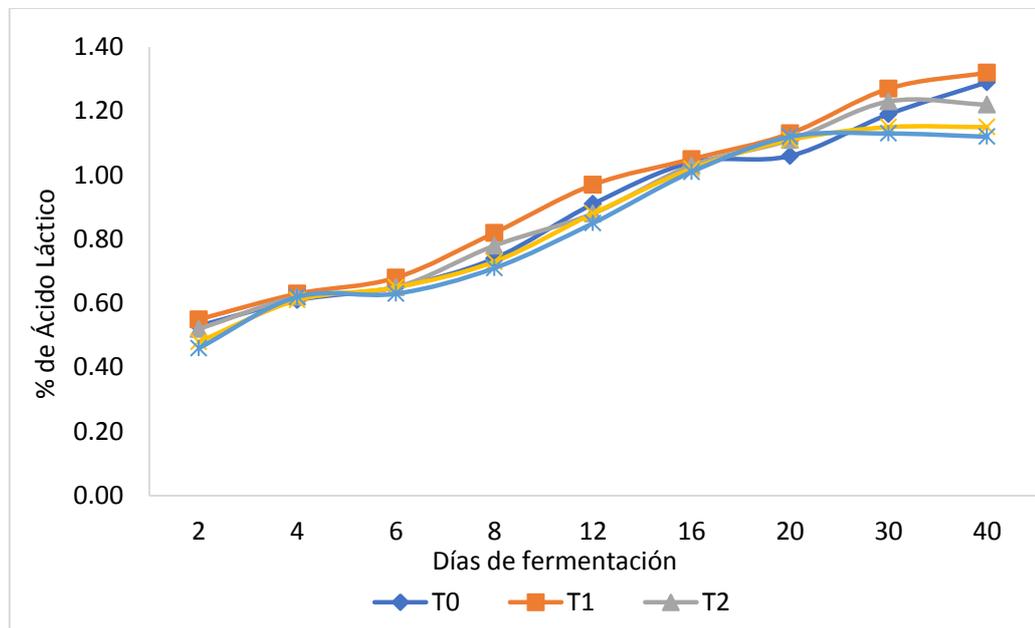
*Cambio del % de Ácido Láctico en función de los días de fermentación del ensilaje en cada tratamiento*

Tratamientos	Días de fermentación																	
	2	Sig.	4	Sig.	6	Sig.	8	Sig.	12	Sig.	16	Sig.	20	Sig.	30	Sig.	40	Sig.
<b>T0</b>	0,53	<b>BC</b>	0,61	<b>A</b>	0,65	<b>AB</b>	0,74	<b>AB</b>	0,91	<b>A</b>	1,04	<b>A</b>	1,06	<b>A</b>	1,19	<b>AB</b>	1,29	<b>C</b>
<b>T1</b>	0,55	<b>C</b>	0,63	<b>A</b>	0,68	<b>B</b>	0,82	<b>C</b>	0,97	<b>B</b>	1,05	<b>A</b>	1,13	<b>A</b>	1,27	<b>C</b>	1,32	<b>C</b>
<b>T2</b>	0,52	<b>ABC</b>	0,62	<b>A</b>	0,65	<b>AB</b>	0,78	<b>BC</b>	0,88	<b>A</b>	1,03	<b>A</b>	1,11	<b>A</b>	1,23	<b>BC</b>	1,22	<b>B</b>
<b>T3</b>	0,48	<b>AB</b>	0,61	<b>A</b>	0,65	<b>AB</b>	0,73	<b>AB</b>	0,88	<b>A</b>	1,02	<b>A</b>	1,11	<b>A</b>	1,15	<b>A</b>	1,15	<b>A</b>
<b>T4</b>	0,46	<b>A</b>	0,62	<b>A</b>	0,63	<b>A</b>	0,71	<b>A</b>	0,85	<b>A</b>	1,01	<b>A</b>	1,12	<b>A</b>	1,13	<b>A</b>	1,12	<b>A</b>
<b>X</b>	0,51		0,62		0,65		0,76		0,90		1,03		1,11		1,19		1,22	
<b>CV</b>	4,22		4,62		1,83		2,30		2,40		1,44		2,77		1,68		0,98	

*Nota:* X: Media, CV: Coeficiente de variación, Sig: Significancia

**Figura 3**

*Variación del porcentaje de ácido láctico en función de los días de fermentación*



El porcentaje de ácido láctico a las 48 horas de haber iniciado el proceso fermentativo presenta una variación entre tratamientos, obteniendo el valor más alto de 0,55% en el tratamiento T1, mientras que el porcentaje más bajo 0,46 % se obtuvo en el tratamiento T4. En los días 4, 16 y 20 estas variaciones se estabilizan en todos tratamientos; a los 30 y 40 días de fermentación la variación del porcentaje de ácido láctico nuevamente se incrementa, los valores más bajos de 1,13 y 1,12% respectivamente están presentes en el tratamiento T4, mientras que los porcentajes más altos están en el tratamiento T1 a los 30 días: 1,27% y a los 40 días: 1,32%.

El análisis estadístico (ANOVA) muestra que en los días 2, 6, 8, 12, 30 y 40 de fermentación existe diferencia significativa entre todos los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Durante los días 4, 16 y 20 no existe diferencia significativa entre tratamientos ( $p > 0,05$ ).

Woolford en 1984 menciona que los cambios en la concentración de ácido láctico están relacionados con la presencia de microflora epífita propia de los forrajes y que en

condiciones anaerobias para un buen ensilaje los grupos deseables y predominantes deben pertenecer al grupo de bacterias productoras de ácido láctico, las cuales serán predominantes de acuerdo con el contenido de azúcares y contenido de materia seca de los materiales usados en el ensilaje.

Las principales bacterias que se asocian con el proceso fermentativo del ensilaje y con la producción de ácido láctico pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. (Garcés, Berrio, Ruíz, Serna, & Builes, 2004)

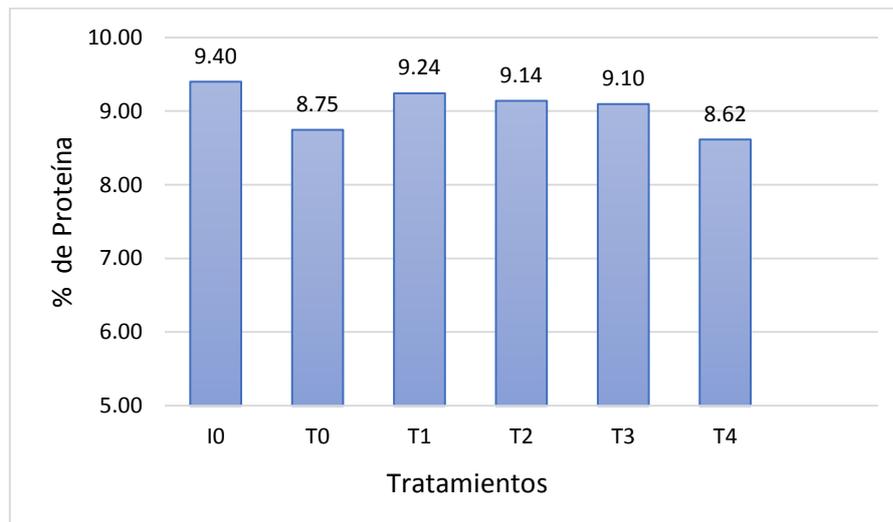
Las propiedades de las bacterias ácido lácticas para producir ácido láctico, así como la tolerancia a condiciones ácidas o de presión osmótica, y el uso de sustratos adicionales influyen sobre la capacidad de competencia de las BAL frente a otros grupos de microorganismo que pueden ser causantes de un deterioro temprano del ensilaje produciendo al final otros compuestos químicos como ácido acético y butírico.

El ensilado de gramíneas para considerarse como buenos deben tener un valor de ácido láctico de 1.5 a 2.5 como porcentaje de la materia seca. (Jiménez, Rodríguez, & González, 2005)

### **Proteína Bruta (PB)**

**Figura 4**

*Porcentaje de proteína pre - ensilaje versus valores de proteína obtenidos al finalizar el estudio con cada tratamiento establecido*



Los valores de proteína determinados en el forraje picado antes del empacado para el ensilado fue de 9,40 %, luego de finalizado el tiempo y posterior apertura de los ensilajes (40 días) los porcentajes determinados en la mayoría de los tratamientos disminuyeron en un porcentaje mínimo en comparación con el pasto pre ensilado. El tratamiento número cuatro ( $3 \times 10^6$  UFC/ml) presento el porcentaje más bajo de proteína bruta (PB) 8,62%, seguido por el testigo (T0) con un valor de 8,75% de PB, mientras que el tratamiento T1 ( $0,5 \times 10^6$  UFC/ml) mostro el valor más alto de entre todos los tratamientos, alcanzando en el análisis proximal un valor de 9,24%.

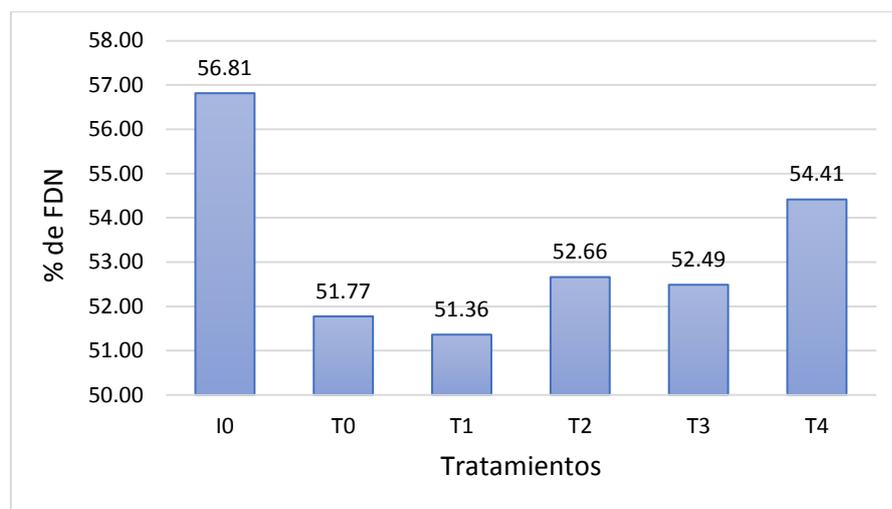
El porcentaje de proteína de 10,0% en ensilaje de avena mostrado por Elizalde & Gallardo (2003) está en un punto de porcentaje mayor al obtenido en cada tratamiento; para su estudio utilizaron avena en estado fenólico de grano pastoso, cortado y picado 120 días después de la siembra, sin adición de ningún inóculo; estos datos son análogos con lo

reportado por Calsamiglia, Ferret, & Bach, (2016) de la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA) hacen referencia a un valor de 10,1 % de PB cuando el porcentaje de materia seca es del 20 al 25% y un valor de 8,91% de PB cuando el forraje tiene un 25 al 30% de materia seca, coincidiendo con los porcentajes de PB de cada tratamiento reportados en la figura 5.; observándose que la adición de bacterias ácido lácticas al pasto picado ayuda a evitar una pérdida mayor de proteína bruta ya que el proceso del ensilado no mejora en ningún caso la calidad inicial del forraje y cuando se realiza de manera adecuada se limita a conservar los nutrientes iniciales. (Mier, 2009)

### **Fibra Detergente Neutro (FDN)**

**Figura 5**

*Porcentaje de FDN pre - ensilaje en comparación con los tratamientos experimentales*



La determinación de la fibra detergente neutro (FDN) nos permite estimar las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina (paredes celulares) presentes en el forraje, las cuales se asocian negativamente con la ingestión de materia seca, cuando mayor es el porcentaje de FDN el consumo de forraje es menor. Los valores de FDN de todos los tratamientos experimentales bajaron en su porcentaje en comparación con el pasto del día cero (pasto picado antes de realizar el ensilaje).

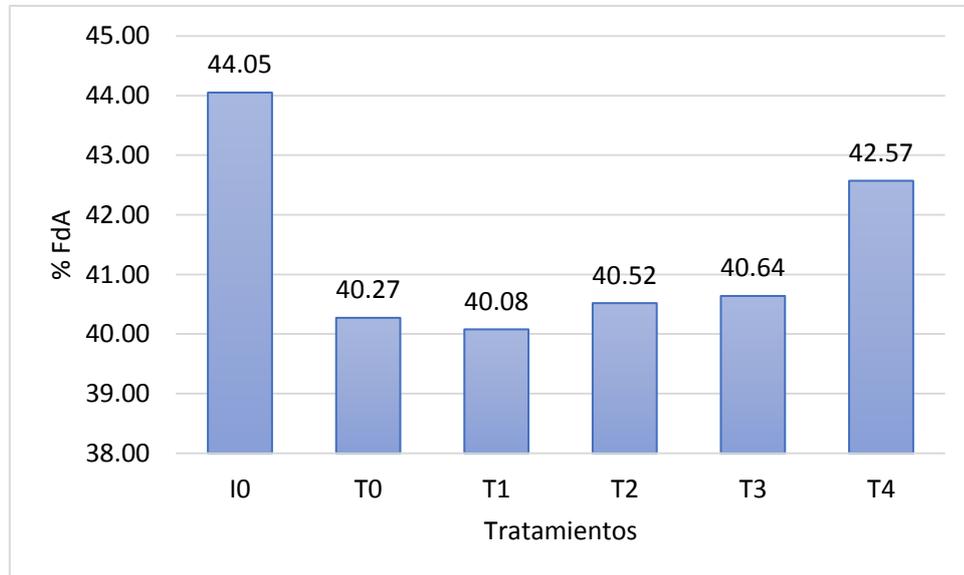
Los porcentajes obtenidos indican que el tratamiento uno ( $0,5 \times 10^6$  UFC/ml) presenta el valor más bajo de FDN 51,36% en relación con el punto cero (pasto picado pre ensilado), mientras que el tratamiento T4 presentó un valor de 54,41% siendo este el más alto de todos los tratamientos experimentales. Con los datos obtenidos se puede evidenciar el efecto positivo que tienen las bacterias ácido lácticas en disminuir los valores de FDN, por lo que, en el tratamiento uno se puede predecir que habrá un mayor consumo de materia seca. (Suaña, 2017)

Apréiz, Insuasty, Portilla, & Hernández (2012) mencionan que los niveles de FDN dependen del estado de madurez de la planta al momento del ensilaje, obteniendo un valor medio de 55% para pasturas de avena en su investigación. En otra investigación realizada por Oliveira et al. (2017) reportan un porcentaje de 49,93% de FDN con la aplicación de inoculantes de bacterias homo y heterofermentativas, siendo este valor inferior al encontrado con esta investigación, desconociendo el estado vegetativo de la avena forrajera usada para el ensilaje; mientras que, Calsamiglia et al., (2016) de la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA) reportan un valor de 60,1 cuando la materia seca es de 25 a 30%, y de 57,1% de FDN cuando la materia seca es de 30 – 35%, siendo estos valores superiores a los encontrados, considerando que no se usó inoculantes bacterianos.

### Fibra Detergente Ácido (FDA)

**Figura 6**

Porcentaje de FDA del punto cero (I0) en comparación con los tratamientos experimentales



La determinación de fibra detergente ácido (FDA) es importante ya que al estar constituida principalmente por fracciones de celulosa y lignina, puede afectar de manera negativa la nutrición de los animales, ya que tiene una relación inversamente proporcional con la digestibilidad y con el contenido energético del forraje (Calsamiglia, 1997).

Al comparar cada uno de los tratamientos experimentales (T1, T2, T3 y T4) con el punto cero (I0) que corresponde al pasto picado antes del ensilado, todos incluido el testigo (T0) presentan un porcentaje inferior de FDA, viéndose el efecto positivo de los inóculos bacterianos aplicados.

El tratamiento T1 (0,5x10<sup>6</sup>UFC/ml) con 40,08% de FDA es el que mejor digestibilidad tendría, mientras que, el tratamiento T4 (3x10<sup>6</sup>UFC/ml) es el que presenta menor digestibilidad con un valor de FDA de 42,57% siendo el valor más alto de todos los tratamientos.

La Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA) menciona que cuando el porcentaje de materia seca en el forraje es de 20 a 25% el valor de FDA es de 41,3% y cuando la materia seca es del 25 al 30% el valor de FDA es de 38,8% (Calsamiglia et al., 2016). Al comparar estos valores con los encontrados en este estudio son similares a los reportados ya que el porcentaje de humedad del pasto ensilado era mayor al 70%.

En la investigación desarrollada por Apráez et al. (2012) determinaron un valor para FDA de 43,63%, siendo este porcentaje mayor al encontrado en esta investigación posiblemente a causa de que no se usaron inóculos bacterianos, relacionándose negativamente con la digestibilidad. Cuando en los ensilajes de avena se encuentran valores superiores al 50% de FDA corresponde a ensilajes de mala calidad, siendo el valor óptimo 25% y valor medio 35%. (Apráez, Insuasty, Portilla, & Hernández, 2012)

## Capítulo V

### Conclusiones y Recomendaciones

#### **Conclusiones**

Las bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas de avena forrajera (epifitas) en este estudio fueron: *Lactobacillus acidophilus* y *Pediococcus acidilactici*, estas son homofermentativas y específicas para ser usadas en este pasto donde presentan un efecto positivo mayor.

El uso de un inóculo de bacterias ácido lácticas propias de silo de avena no tienen un efecto marcado sobre la variable temperatura ya que esta se mantiene estable en todos los tratamientos experimentales, independientemente de la concentración de bacterias usadas (UFC / ml).

Las bacterias propias de ensilaje de avena tienen un efecto positivo sobre la variable pH ya que en todos los tratamientos se evidencio una disminución de este valor por debajo de los intervalos clasificados como excelentes (< 4,2 pH), siendo el tratamiento 4 el que más bajo pH presento.

El porcentaje de ácido láctico en el tratamiento uno ( $0,5 \times 10^6$  UFC / ml) es el más alto, seguido por el testigo (0 UFC / ml) y el valor más bajo se encontró en el tratamiento T4, pese a tener un mayor número de unidades formadoras de colonias por mililitro; evidenciándose que el balance adecuado de UFC por ml es de  $0,5 \times 10^6$ .

La evaluación del porcentaje de proteína bruta transcurridos 40 días de proceso fermentativo y en comparación con el punto inicial (día cero) dio como mejor resultado al tratamiento uno con una concentración de  $0,5 \times 10^6$  UFC/ml., ya que en este existió menor pérdida de nutrientes, mientras que en el tratamiento 4 existió mayor pérdida de PB seguido

por el tratamiento en el que no se usó el inóculo de bacterias; evidenciado el efecto positivo del inóculo bacteriano.

La determinación de FDN mostro que el tratamiento uno presenta el porcentaje más bajo (51,36%) relacionándose positivamente con el consumo.

Los porcentajes de FDA evidencian el menor porcentaje en el tratamiento uno y el más alto en el tratamiento experimental 4, guardando una relación inversa con la digestibilidad y el contenido energético del forraje.

El uso de bacterias homofermentativas muestra un efecto positivo sobre la mayoría de las variables de calidad nutricional y fermentativa del ensilaje de avena.

### ***Recomendaciones***

Se recomienda usar concentraciones de bacterias ácido-lácticas de  $0,5 \times 10^6$  UFC/ml, por los resultados obtenidos en las variables nutricionales y fermentativas en esta investigación.

El uso de inóculos bacterianos para ensilajes deben ser específicos para cada forraje (gramíneas - leguminosas), ya que no todas las bacterias ejercen el mismo efecto en todos los pastos y deben ser aplicados para ensilar pastos con alta humedad y en los que el proceso de picado no sea óptimo.

Llevar acabo un estricto control durante el proceso del ensilado para asegurar que la compactación y por ende la exclusión de oxígeno sea la adecuada, para evitar el deterioro temprano del ensilaje.

Se debe tener cuidado con el manejo de los microorganismos a usarse ya que son susceptibles a condiciones adversar del ambiente, en los que su efecto podría verse anulado.

La aplicación de inóculos de bacterias homofermentativas o/y heterofermentativas para ensilajes están ligados a los diferentes efectos que presentan, por lo que se recomienda continuar con investigaciones en los que se compare estos efectos positivos con parámetros productivos.

## Bibliografía

- Apréaz, J., Insuasty, G., Portilla, J., & Hernández, W. (2012). Composición nutritiva y aceptabilidad del ensilaje de avena forrajera (*Avena sativa*), enriquecido con arbustivas: acacia (*Acacia decurrens*), chilca (*Braccharis latifolia*) y sauco (*Sambucus nigra*) en ovinos. . *Vet Zootec* , 25-35.
- Bolsen, K. (2005). *The Silage Triangle: Four Important Practices. Feed Grain & Forage Opportunities* . Obtenido de Proceedings from a Conference on Feeding, Growing & Selling series: [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/crop8037](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/crop8037)
- Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). *Cuenta en placa de bacterias*. Obtenido de En Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos (2da ed.). México: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBas>
- Campo, Y., Valero, J., & Gómez, M. (2015). *Evaluación de ensilajes a partir de residuos de post-cosecha de arroz tratados con bacterias ácido lácticas*. Obtenido de Alimentos Hoy, 74: <http://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/345/295>
- Contreras, F., & Muck, R. (2006). *Inoculantes Microbiales para ensilaje. Focus on Forage (Vol. 8)*. Obtenido de <https://fyi.uwex.edu/forage/files/2014/01/Microbial-Inoculants-for-Silage-Espanol.pdf>
- Contreras, F., Marsalis, M., & Lauriault, L. (2009). Inoculantes microbiales para ensilaje: Su uso en condiciones de clima cálido. *Las Cruces - Nuevo Mexico*.
- Dumont, J. (2006). *Conservación de forrajes. Remehue*. Obtenido de [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_reservas/reservas\\_en\\_general/31-conservacion\\_ISEA.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_en_general/31-conservacion_ISEA.pdf)
- Flores, M., Sánchez, R., Gutiérrez, R., & Echavarría, F. (2014). *Microsilos: una alternativa para pequeños productores (Instituto)*. Calera de Víctor Rosales, Zacatecas. Obtenido de Folleto para Productores No 38: <http://www.zacatecas.inifap.gob.mx/publi>
- Garcés, M., Berrio, L., Ruíz, S., Serna, J., & Builes, A. (2004). *Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado, 1*, 66-71. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69511010>
- García, E., & Fernández, I. (2012). *Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl*. Obtenido de Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural: <https://riunet.upv.es/handle/10251/16338>
- Honig, H., & Woolford, M. (1980). Changes in silage on exposure to air. *Forage conservation in the 80's (Occasional Symposium No.11)*, 76-87.
- Jiménez, A., Rodríguez, R., & González, R. (2005). *Conservación de forrajes de forrajes, 1-94*. Obtenido de [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_reservas/reservas\\_en\\_general/31-conservacion\\_ISEA.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_en_general/31-conservacion_ISEA.pdf)

- Martinez, E., Pulido, R., & Latrille, L. (2002). Efecto de la paja de trigo tratada con alcali sobre el consumo de alimento y comportamiento ingestivo de vacas lecheras. . *Archivos de Medicina Veterinaria*, 34 , 199-212.
- Mier, M. (2009). Caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero. *Universidad de Córdoba, Córdoba*.
- Muck, R. (2008). *Improving alfalfa silage quality with inoculants and silo management*. . Obtenido de Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers: <https://naldc-legacy.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=27143&content=PDF>
- Nsereko, V., Smiley, B., Rutherford, W., Spielbauer, A., Forrester, K., Hettinger, G., & Harman, B. (2008). Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 122-135.
- Oliveira, A. W., Ogunade, I., Cervantes, A., Arriola, K., Jiang, Y., & Adesogan, A. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100. .
- Oude, S., Driehuis, F., Gottschal, J., & Spoelstra, S. (1999). *Silage fermentation processes and their manipulation*. En *Silage Making in the Tropics with Particular Emphasis on Smallholders*. Obtenido de Roma: Proceedings of the FAO Electronic Conference on Tropical Silage: <http://www.fao.org/docrep/005/X8486E/x8486e09.htm#bm9>
- Piñeiro, G. (2010). *Manual práctico LactoSilo para lograr ensilados de calidad*. En Becker Underwood (Ed.).
- Ramírez, J., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. . Obtenido de Revista Fuente Año 2, No. 7: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
- Rodríguez, V. (2006). *El ensilaje como método de conservación de forrajes*. . Obtenido de Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5972/T15861RODR>
- Soto, R. (2010). *Producción y conservación de forrajes*. Obtenido de Direccion regional central oriental - Agencia de servicios agropecuarios de Turrialba, 1-20.: [http://www.infoagro.go.cr/Inforegiones/RegionCentralOriental/Documents/Manual de produccion y conservacion de forrajes](http://www.infoagro.go.cr/Inforegiones/RegionCentralOriental/Documents/Manual%20de%20produccion%20y%20conservacion%20de%20forrajes)
- Suaña, G. (2017). Ensilado de Avena (Avena sativa) con adición de urea y nitroshure en tres niveles en bolsas de polietileno en Puno. . *Universidad Nacional del Altiplano*.
- Tobía, C., & Vargas, E. (2000). Inoculos bacterianos: Una alternativa para mejorar el proceso fermentativo en los ensilajes tropicales. *Nutrición Animal Tropical Vol. 6, No1*, 129-143.
- Tobía, C., Uribe, L., Villalobos, E., Soto, H., & Ferris, I. (2003). Aislamiento, selección y caracterización de bacterias ácido lácticas en ensilajes de soya. *Agronomía Costarricense*, 21-27.

- Valencia, A., Hernández, A., & López, L. (2011). *El ensilaje: ¿qué es y para qué sirve?* Obtenido de Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana.:  
<https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num2/articulos/ensilaje/>
- Weinberg, Z. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(1), 53-68. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(96\)00025-3](https://doi.org/10.1016/0168-6445(96)00025-3)
- Wilkinson, J., Bolsen, K., & Lin, C. (2003). *Silage science and technology*, 1-30. Obtenido de History of Silage: <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c1>
- Yitbarek, M., & Tamir, B. (2014). Silage Additives: Review. *Open Journal of Applied Sciences*, 4, 258-274.

**Anexos**