

FERMENTACIÓN DE ENSILAJES TROPICALES CON LA UTILIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS EN CUBA

Lisette Luis, M. Esperance, F. Ojeda, O. Cáceres y H. Santana

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
Matanzas, Cuba**

Con el objetivo de contribuir al incremento de la calidad de los ensilajes de forrajes tropicales mediante el empleo de aditivos biológicos, se utilizaron dos bacterias ácido lácticas, *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus plantarum* (previamente estudiadas y clasificadas), como inoculantes de ensilajes de *Pennisetum purpureum* y *Panicum maximum*. Los forrajes fueron cortados entre 9 y 10 semanas y entre 6 y 7 en uno y otro caso y fertilizados con 60 kg N/ha/corte. El material se trocea hasta fracciones de 2 cm, se introdujo en silos de 30 y 200 kg y se apisonó fuertemente hasta obtener una buena compactación. Después de 60 días de conservación se determinaron los indicadores bioquímicos y bromatológicos; MS, pH, N-NH₃, Nt, AGV, MO, PB, FB y el valor nutritivo en 5 ovinos machos castrados en los que se estudió digestibilidad y consumo de nutrimentos. Como resultado de este trabajo se obtuvo que la inoculación biológica mejoró la calidad fermentativa de los ensilajes, ya que disminuyó la producción de metabolitos indeseables como ácidos acético, butírico y nitrógeno amoniacal e incrementó significativamente el consumo y la digestibilidad de la MO, PB y FB, especialmente cuando la bacteria utilizada fue *Pediococcus acidilactici*. Se recomienda continuar los trabajos con este tipo de inoculante y extender a escala comercial la aplicación de dicho aditivo biológico.

Palabras claves: Bacterias ácido lácticas, ensilaje

Two lactic acid bacteria previously studied and classified (*Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum*) were used as inoculants for silages from *Pennisetum purpureum* and *Panicum maximum* in order to increase silage quality of tropical forages by means of biological additives. Forages were cut after 9-10 or 6-7 weeks and 60 kg of M/ha/cut were supplied. Plant material was chopped to 2 cm length, loaded in 30 and 200 kg silos and pressed for a suitable compactation. Biochemical and bromatological indicators were determined after 60 days of conservation (DM, pH, N-NH₃, TN, VFA, OM, CP, CF and nutritive value). Five wethers were used for digestibility and intake determinations. Biological inoculation improved fermentative quality to silages as undesirable metabolites (acetic acid, butyric acid and ammonia nitrogen) were decreased. Intake and digestibility (OM, CP and CF) were significantly increased whenever *Pediococcus acidilactici* bacterium was used. We concluded to continue working with this type of inoculant. The commercial use of the biological additive is suggested.

Additional index words: Lactic acid bacteria, silage

La existencia en nuestro país de dos estaciones bien diferenciadas, una lluviosa donde abundan los pastos y forrajes y otra poco lluviosa en que estos escasean ha conllevado a utilizar diferentes vías en la conservación de alimentos para el consumo animal en períodos donde existe poca disponibilidad.

Una de ellas es la fabricación de ensilajes con los excedentes de pastos y forrajes, obtenidos en la época de más abundancia. Esta forma de conservación tiene algunos inconvenientes relacionados con su valor nutritivo, técnicas de confección y costo, lo cual ha estimulado la búsqueda de métodos que disminuyan esos efectos.

Se han estudiado distintos métodos para mejorar la calidad de los ensilajes, como el uso de melaza en diferentes concentraciones y de aditivos químicos de variado efecto (García, 1980; Ojeda, 1986). No obstante, existen algunas dificultades en el uso de dichos conservantes, como su elevado costo en el caso de la miel y de algunos aditivos químicos, así como su efecto corrosivo y las altas dosis que a veces es necesario aplicar, unido a problemas en la manipulación de los mismos (Ojeda, Varfolomiev y Esperance, 1982).

Investigadores de otras partes del mundo han encontrado que con el uso de inoculante biológico no solo se mejora la calidad fermentativa del ensilaje (Gouet, 1985), sino además los indicadores de consumo y digestibilidad del mismo (Lindgren, Lingvall, Kaspersson, Kartzow y Rydberg, 1983); estos resultados indujeron a obtener y aplicar en condiciones tropicales, bacterias ácido-lácticas, con el objetivo de mejorar la calidad de los ensilajes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pastos, edad y fertilización. Los forrajes utilizados fueron: *Pennisetum*

purpureum cv. Taiwan-144 y *Panicum maximum* cv. Likoni, los que se cortaron entre 9 y 10 y entre 6 y 7 semanas respectivamente. Ambos forrajes fueron fertilizados con 60 kg N/ha/corte.

Tratamientos y diseño. Con la guinea likoni se realizaron dos experimentos:

1. Forraje sin aditivo; forraje + ácido fórmico (5 l/t); forraje + *Pediococcus acidilactici* y forraje + *Lactobacillus plantarum*.
2. Forraje sin aditivo; forraje + *L. plantarum*; forraje + *L. plantarum* + 2 % miel; forraje + *P. acidilactici* y forraje + *P. acidilactici* + 2 % miel.

El taiwan-144 se ensiló fresco y presecado y se utilizaron para su estudio los mismos tratamientos: forraje sin aditivo; forraje + ácido fórmico (5 l/t); forraje + *P. acidilactici* y forraje + *L. plantarum*.

Como unidad experimental se emplearon silos metálicos de 30 kg de capacidad y silos piloto de 200 kg, para realizar las pruebas de valor nutritivo. Todos los ensilajes se analizaron después de 60 días de conservación, para lo cual se utilizaron 4 réplicas por tratamiento y un diseño experimental totalmente aleatorizado.

Procedimiento experimental. El forraje a ensilar fue cortado con silocosechadora E-281, a una altura de 10 cm, y se obtuvieron partículas de 2 cm aproximadamente. Este material se introdujo en los silos y se apisonó fuertemente hasta obtener una buena compactación, después de lo cual se sellaron y se colocaron en lugar ventilado y fresco hasta el momento de su apertura.

La inoculación se efectuó con las bacterias *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus plantarum*, obtenidas de ensilajes de pastos tropicales en el laboratorio de Microbiología de la EEPF (Luis y Ramírez, 1991). El inoculante se preparó en medio MRS líquido (Oxoid Manual, 1980) y se inoculó al 10% del volumen total con un cultivo puro de

bacterias incubadas a 35°C durante 24 horas en cultivo estático.

La dosis aplicada fue de 1 l/t de forraje verde, lo que representó añadir 10^7 ufc/g MV. Se adicionó con asperjadora manual, diluido en agua corriente.

El ácido fórmico se añadió a razón de 5 l/t (Ojeda, 1986) y la miel al 2% (9% carbohidratos solubles), en correspondencia con el contenido de CHS del forraje que se determinó previamente (Somogyi, 1952).

El valor nutritivo de los ensilajes se evaluó en 5 ovinos machos castrados, sometidos a un período de adaptación de 15 días y 6 días de mediciones.

Mediciones. Se determinaron los indicadores bioquímicos y bromatológicos: MS, pH, ácido acético, butírico, isobutírico y propiónico, así como la producción de amoníaco y el nitrógeno total (Nt); MO, PB y FB, la digestibilidad y el consumo de esos indicadores y el consumo de nutrimentos: MSD, EM y PBD.

Métodos analíticos. La MS se determinó en estufa de ventilación forzada durante 48 h; pH en potenciómetro con electrodo de vidrio; ácidos grasos volátiles por el método de cromatografía gaseosa de Jouany (1981); amoníaco por el método de microdifusión de Conway (1957) y el nitrógeno total por Kjeldahl, determinado en fresco (AOAC, 1965).

Los indicadores del valor nutritivo fueron obtenidos utilizando el método de la colección total de heces fecales y por las técnicas descritas por García-Trujillo y Cáceres (1984).

La composición bromatológica de los forrajes que se conservaron se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Composición bromatológica de los forrajes conservados.

	Guinea likoni	Taiwan-144	Taiwan-144 presecado
MS (%)	34,5	27,5	38
PB (%)	6,07	7,6	7,13

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al utilizar como aditivo biológico en ensilajes de guinea likoni (tabla 2) *P. acidilactici* y *L. plantarum*, se observó su eficiencia en el control de la mayoría de los indicadores fermentativos estudiados; entre ambos se destacó el primero, que fue tan o más eficaz que el ácido fórmico para disminuir el pH, la producción de ácido acético, isobutírico y amoníaco. Este efecto positivo puede atribuirse a la presencia de las bacterias ácido lácticas en forma dominante en el sistema, lo que favorece una buena fermentación (Gouet, 1985).

Al ensilar taiwan-144 en fresco (tabla 3), se observó que hubo un efecto significativo sobre la conservación cuando se utilizaron las bacterias *L. plantarum* y *P. acidilactici*, con mejores resultados en el control del ácido acético y el nitrógeno amoniacal, cuando se utilizó el último de estos aditivos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Henderson y McDonald (1984) al utilizar diferentes inoculantes comerciales.

Tabla 2. Efecto de la inoculación de bacterias ácido lácticas sobre ensilajes de guinea likoni.

Tratamientos	pH	Acidos (% MS)				NH ₃ -N/% N _t
		Acético	Butírico	Isobutírico	Propiónico	
<i>P. acidilactici</i>	4,5 ^{bc}	1,69 ^c	12,8 ^c	0,13 ^b	0,38 ^c	3,59 ^c
<i>L. plantarum</i>	4,6 ^{ab}	3,34 ^b	19,7 ^a	0,36 ^a	0,76 ^b	4,46 ^b
Fórmico	4,4 ^c	2,46 ^b	2,10 ^d	0,15 ^b	0,33 ^d	5,56 ^a
Control	4,7 ^a	5,70 ^a	14,04 ^b	0,27 ^{ab}	1,52 ^a	5,98 ^a
ES ±	0,03*	0,21**	1,3**	0,04*	0,012*	0,13*

a,b,c,d Letras no comunes en columnas difieren para P<0,05 (Duncan, 1955)

* P<0,05

** P<0,01

Tabla 3. Efecto de la inoculación sobre la conservación de taiwan-144, ensilado en fresco.

Tratamientos	pH	Acético	Butírico	NH ₃ -N/% N _t
		(% MS)		
P. acidilactici	4,2 ^b	2,68 ^c	0,318 ^b	4,85 ^d
L. plantarum	4,1 ^b	4,66 ^b	0,098 ^b	5,37 ^c
Fórmico	3,9 ^c	2,13 ^d	0,039 ^b	6,10 ^b
Control	4,4 ^a	4,71 ^a	2,96 ^a	6,52 ^a
ES ±	0,03*	0,01*	0,19*	0,01*

a,b,c,d Letras no comunes en columna difieren para P<0,05 (Duncan, 1955)

* P<0,05

Aunque se ha señalado que el alto contenido de MS del forraje da origen o ensilajes de alta calidad, por el efecto inhibidor de la presión osmótica sobre el crecimiento clostrídico fundamentalmente (Ohyama, 1984 y O'Leary, 1967), el presecar el taiwan-144 (tabla 4) no tuvo un mejor efecto sobre la conservación que la aplicación de *P. acidilactici*, por lo que este inoculante resulta adecuado para la conservación de dicho forraje en su estado fresco o presecado.

La menor efectividad de *L. plantarum* puede atribuirse, en primer lugar, a que este posee una fase de latencia larga (O'Leary, 1987), lo que retarda el inicio de la fermentación; en segundo lugar, al efecto adicional que puede tener la presión osmótica sobre este tipo de microorganismo, y en tercero a que esta bacteria produce ácido láctico, pero lentamente, mientras que el pH no alcance valores menores que 5,0 (Vanbelle, Bertin y Hellings, 1985).

Tabla 4. Efecto de la adición de bacterias ácido lácticas sobre la fermentación de taiwan-144 presecado.

Tratamientos	pH	Acético (% MS)	Butírico	NH ₃ -N/% N _t
<i>P. acidilactici</i>	4,8 ^a	0,15 ^d	0,25 ^d	6,62 ^d
<i>L. plantarum</i>	5,0 ^a	7,71 ^a	9,01 ^a	12,30 ^a
Fórmico	4,1 ^b	0,30 ^c	0,29 ^c	8,60 ^c
Control	4,9 ^a	0,31 ^b	1,65 ^b	9,20 ^b
ES ±	0,14***	0,03***	0,03***	0,05**

a,b,c,d Letras no comunes en columna difieren para P<0,05 (Duncan, 1955)

* P<0,01

*** P<0,001

El contenido de PB de los ensilajes piloto desde el punto de vista del valor nutritivo puede considerarse como aceptable, al igual que la FB que osciló entre 29,5 y 33,8% (tabla 5). Estos valores explican los consumos de MSD (tabla 6), que permitieron alcanzar un nivel de alimentación superior al de mantenimiento, lo cual difiere de los resultados obtenidos por Ojeda, Esperance, Luis y Cáceres (1987) al utilizar un aditivo biológico de área templada. El efecto más marcado en este indicador correspondió al tratamiento con *L. plantarum*, seguido de *P. acidilactici*, aunque este no difirió significativamente del control. Para el consumo de EM

también se manifestó un incremento con la utilización de las bacterias ácido lácticas y aunque el consumo de PBD no mostró diferencias significativas con relación al control, mantuvo niveles adecuados en todos los tratamientos (Cáceres, 1985).

La digestibilidad de los nutrimentos se vio incrementada significativamente cuando se utilizó *P. acidilactici* (tabla 7), mientras que la adición de miel no la aumentó; los valores hallados para la digestibilidad de la materia orgánica, la proteína y la fibra fueron superiores a los encontrados por Esperance (1981) y Ojeda (1986) en ensilajes de gramíneas tropicales.

Tabla 5. Composición bromatológica (%) e indicadores fermentativos de ensilajes de guinea likoni inoculada con aditivo biológico en silos piloto.

Tratamientos	MS	MO	PB	FB	pH	NH ₃ / % N _t	Acido butírico (g/kg MS)
Control	38,1	89,4	7,5	29,5	4,7 ^a	0,92 ^b	1,605 ^a
<i>L. plantarum</i>	37,3	89,6	6,5	31,3	4,3 ^b	0,88 ^b	1,185 ^a
<i>L. plantarum</i> + miel (2 %)	37,0	89,8	6,4	30,8	4,1 ^c	0,80 ^b	0,065 ^b
<i>P. acidilactici</i>	37,6	90,1	7,6	33,8	4,0 ^c	1,17 ^a	0,035 ^b
<i>P. acidilactici</i> + miel (2 %)	37,0	90,1	6,9	30,5	4,3 ^b	1,30 ^a	0,050 ^b
ES ±	0,5	0,8	1,1	0,9	0,04***	0,03***	0,133***

a,b,c Letras no comunes en columna difieren para P<0,05 (Duncan, 1955)

*** P<0,001

Tabla 6. Consumo de nutrimentos de ensilajes de guinea likoni conservada con aditivo biológico en silos piloto.

Tratamientos	MSD g/kg PM	EM Kcal/kg PM	PED g/kg PM
Control	28,9 ^{bc}	107,0 ^b	2,26 ^{ab}
<i>L. plantarum</i>	31,1 ^a	115,8 ^a	2,46 ^{ab}
<i>L. plantarum</i> + miel (2 %)	28,1 ^c	106,3 ^b	2,05 ^b
<i>P. acidilactici</i>	30,0 ^{ab}	112,5 ^a	2,74 ^a
<i>P. acidilactici</i> + miel (2 %)	28,0 ^c	104,0 ^b	2,14 ^b
ES ±	0,41**	1,3**	0,03**

a,b,c Letras no comunes en columna difieren para P<0,05 (Duncan, 1955)

** P<0,01

Tabla 7. Digestibilidad (%) de ensilajes piloto de guinea likoni inoculada con aditivo biológico.

Tratamientos	MO	PB	FB
Control	55,0 ^{bc}	53,6 ^b	51,9 ^d
<i>L. plantarum</i>	55,3 ^b	52,3 ^b	57,3 ^b
<i>L. plantarum</i> + miel (2 %)	54,4 ^c	50,0 ^b	53,7 ^{cd}
<i>P. acidilactici</i>	56,6 ^a	63,0 ^a	62,2 ^a
<i>P. acidilactici</i> + miel (2 %)	55,5 ^b	51,8 ^b	56,7 ^{bc}
ES ±	0,3***	3,5***	1,2*

a,b,c,d Letras no comunes en columna difieren para P<0,05 (Duncan, 1955)

* P<0,05

*** P<0,001

Se ha señalado que los productos resultantes de la fermentación tienen gran incidencia sobre el consumo de nutrimentos (Demarquilly, 1973; Woolford, 1978 y Esperance, 1986), lo que pudo corroborarse en este trabajo, donde se correspondió la mayor calidad de la conservación con el incremento del valor nutritivo de los ensilajes, destacándole *P. acidilactici* como un aditivo biológico efectivo en el proceso.

De los inoculantes biológicos utilizados, resultó significativamente superior *Pediococcus acidilactici*, ya que mejoró el patrón fermentativo del material

conservado, al disminuir la producción de metabolitos indeseables como el ácido butírico, el nitrógeno amoniacal y el ácido acético. Estos efectos repercutieron positivamente en el valor nutritivo del alimento, expresado en un mayor consumo y digestibilidad de los nutrimentos.

No obstante, se recomienda continuar el estudio de estos inoculantes aplicados a otros forrajes y además extender a escala comercial el uso de *P. acidilactici* para la fabricación de ensilajes. Con ello se logra no solo mejorar la calidad de la conservación, sino que se viabiliza una

aplicación menos riesgosa que con aditivos químicos y se eliminan los efectos corrosivos de estos sobre la maquinaria.

REFERENCIAS

- AOAC. 1965. Official methods of analysis (9th ed.). Washington D.C.
- CÁCERES, O. 1985. Factores que afectan el valor nutritivo de gramíneas forrajeras tropicales. Tesis en opción al grado de C.Dr.C. Ese. Superior Agrícola. Praga
- CONWAY, E.J. 1957. Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood, London
- DEMARQUILLY, C. 1973. *Ann. Zootech.* 22:1
- DUNCAN, D.B. 1955. *Biometrics.* 11:1
- ESPERANCE, M. 1981. Utilización del ensilaje para la producción de leche. Tesis presentada en opción al grado de C.Dr.C. CUM-EEPFIH. Cuba
- ESPERANCE, M. 1986. *Pastos y Forrajes.* 9:271
- GARCÍA, H.R. 1980. Ensilaje conservación (I parte). A.Y.M.A. 3:127. XVIII Reunión Científica anual. Gerona, España
- GARCIA-TRUJILLO, R. & CÁCERES, O. 1984. Nuevos sistemas para expresar el valor nutritivo de los alimentos y el requerimiento y racionamiento de los rumiantes. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba
- GOUET, Ph. 1985. Silage: new biological aspects. Symposium Santé Animale. SANOFI. Francia, p. 35
- HENDERSON, A.R. & McDONALD, P. 1984. *Research and Development in Agriculture.* 1:171
- JOUANY, J.P. 1981. *C.R.Z.V. Bull. Tech. Theix.* 46:63
- LINDGREN, S.; LINGVALL, P.; KASPERSSON, A.; KARTZOW, A. de & RYDBERG, ELIZABETH. 1983. *Swedish J. Agric. Res.* 13:91
- LUIS, LISSETTE & RAMÍREZ, MARISOL. 1991. *Pastos y Forrajes.* 14:59
- OHYAMA, Y. 1984. Measuring silage management through research (M. McCullough and Bolsen, eds.). Silage management Nat. Feed Ingrid. Assoc. Des Moines, Iowa
- OJEDA, F. 1986. Estudio de los aditivos químicos para la conservación con ensilajes de cuatro gramíneas tropicales. Tesis presentada en opción al grado de C.Dr.C. ISCAH-ICA. La Habana, Cuba
- OJEDA, F.; ESPERANCE, M.; LUIS, LISSETTE & CÁCERES, O. 1987. *Pastos y Forrajes.* 9:147
- OJEDA, F.; VARFOLOMIEV, G. & ESPERANCE, M. 1982. Uso de aditivos químicos en los ensilajes tropicales. Resúmenes V Sem. Cient. Téc. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 67
- O'LEARY, J. 1987. Inoculants for silage. In: Biotechnology in the Feed Industry. Edited by T. Pearse. Lyons p. 211
- OXOID MANUAL. 1980. Fourth edition. Published by Oxoid Limited. Wade Road, Basingstoke. Hampshire
- SOMOGYI, M. 1952. *J. Biol. Chem.* 195:19
- VANBELLE, M.; BERTIN, G. & HELLINGS, Ph. 1985. *Microbiologie-Aliments-Nutrition.* 3:1
- WOOLFORD, M.K. 1978. *J. Br. Grassld Soc.* 33:131

Recibido el 24 de septiembre de 1991