

UTILIZACIÓN DE ADITIVOS EN LA CONSERVACIÓN DE FORRAJES EN FORMA DE ENSILAJE. I. ADITIVOS BIOLÓGICOS

Lisette Luis, M. Esperance y Marisol Ramírez

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

En la actualidad, en que el Estado cubano ha hecho un llamado para la intensificación de los planes alimentarios en el país, la eficiencia en la producción ganadera se hace indispensable, ya que como se expresara en los objetivos económicos del quinquenio 1985-1990, se impone que junto a los éxitos en la introducción de nuevas variedades de pastos, se trabaje en el mejoramiento de la base alimentaria y en un mayor control de la calidad de los alimentos. No obstante, existen en nuestro país limitaciones desde el punto de vista climatológico para garantizar la producción continuada de pastos y forrajes, debido a la existencia de dos estaciones bien definidas: la lluviosa, donde abundan los pastos, y la poco lluviosa, donde estos escasean.

Este inconveniente se ha tratado de solucionar a través de diferentes mecanismos, entre los cuales la conservación en forma de ensilaje ocupa un lugar destacado a pesar de las deficiencias que presenta, no sólo desde el punto de vista de su composición bromatológica y fermentativa, sino por las pérdidas que se producen durante su confección y por su costo (Esperance, 1981; Esperance y Díaz, 1985).

Una de las vías para mejorar la calidad de los ensilajes la constituye el presecado del forraje, pues incrementa la concentración de azúcares y la presión osmótica, lo que favorece la proliferación de las bacterias ácido lácticas y perjudica el desarrollo de los clostridios (Lampila, Jaakkola, Toivonen y Setälä, 1988). Este método representa una buena opción, a

pesar de que depende de las condiciones climáticas.

Para tratar de eliminar las dificultades que se presentan, se fabrican además ensilajes utilizando aditivos acidificantes, bacteriostáticos y estimuladores de la fermentación láctica, así como presecados o mezclas de gramíneas y leguminosas.

La importancia de lograr fermentaciones lácticas en los ensilajes tropicales no se relaciona sólo con la eficiencia que desde el punto de vista energético y de conservación tiene este tipo de proceso, sino también con las propiedades antimicrobianas que poseen las bacterias ácido lácticas, que actúan sobre otros microorganismos indeseables y contribuyen así a conservar mejor el forraje (Celanie, 1982).

La inoculación con bacterias ácido lácticas representa una vía alternativa para mejorar la calidad de la conservación, y a pesar de que no se tiene ningún antecedente de su uso en el país, sí se poseen referencias de los efectos beneficiosos de su aplicación en otras latitudes.

Uso de conservantes

El uso de aditivos durante la conservación tiene como objetivo favorecer el medio para una buena fermentación, sobre la base de que la acidificación es la que crea un medio ideal, donde el pH alcanzado logra evitar la aparición de fermentaciones negativas que entorpecen la marcha del ensilado.

Arnould (1981) señaló que los conservantes poseen la ventaja de hacer más apetecibles los alimentos, así como de aumentar la masa de ingestión y el nivel de producción y rentabilidad por lo cual su uso se ha extendido.

Tanto Demarquilly (1979) como Arnould (1981), clasificaron los conservantes agrupándolos en la forma siguiente:

- Los ácidos
- Los bacteriostáticos
- Los estimuladores de la fermentación láctica

Los ácidos

El principio de su empleo es simple, ya que su objetivo es disminuir artificialmente la acidez. Estos son considerados como muy seguros y eficaces cuando se utilizan en las dosis requeridas.

Los ácidos minerales han sido ampliamente utilizados, particularmente una mezcla de ácido sulfúrico y clorhídrico denominada AIV. Esta mezcla tiene algunos inconvenientes como la difícil manipulación, acidez elevada de los ensilajes y su bajo consumo.

Este método fue reemplazado posteriormente por la utilización de otros ácidos orgánicos como ácido fórmico, acético, etc.

El empleo de ácidos grasos volátiles de cadena larga ha sido estudiado, pero su inconveniente viene dado por su alto costo.

Los bacteriostáticos

Estos conservantes ejercen su acción directa sobre las bacterias, ya sea inhibiendo todo tipo de crecimiento bacteriano o un grupo específico de ellas. Debido al efecto que ejercen sobre la fermentación, los ensilajes que se

conservan con este tipo de aditivo presentan poca estabilidad cuando son abiertos (Waldo, 1977).

La mayoría de estos conservantes han sido abandonados por razones de ineficacia, pues en muchos casos se requiere el empleo de dosis elevadas, lo que reduce considerablemente la apetecibilidad del forraje. Además, la acción de este tipo de aditivo se extiende al rumen, donde se produce una acción del mismo tipo sobre las bacterias allí presentes (Arnould, 1981).

Estimuladores de la fermentación láctica

Estos conservantes, de acuerdo con su naturaleza se pueden agrupar en tres categorías: aportaderos directos de carbohidratos solubles, aportaderos indirectos de carbohidratos solubles y cultivos bacterianos de cepas lácticas.

Aportadores directos de CHS

Los carbohidratos solubles (CHS) sirven de sustrato energético natural a casi todos los tipos de microorganismos, por lo que esta propiedad hace que en los ensilajes inadecuadamente compactados o mal recubiertos, las levaduras y hongos proliferen más rápidamente (Young, 1978). A su vez, si se propician las condiciones adecuadas, la presencia de suficientes azúcares solubles para los fermentos lácticos, permite que la transformación de estos en ácido láctico alcance cerca del 75%. La acidez alcanzada inhibe las fermentaciones indeseables.

Actualmente las mieles finales son las más utilizadas, pues son portadoras de un 50% de CHS aproximadamente, lo que les confiere una consistencia muy viscosa. Este inconveniente hace que para su uso tengan que ser diluidas desde un 25 hasta un 50%, lo que puede incrementar la cantidad de efluentes en los silos. Es por ello que se recomienda

usarlas en forrajes con 25% de MS o más (Arnould y Moreels, 1978).

Aportadores indirectos de CHS

Determinados cultivos bacterianos producen enzimas capaces de actuar sobre las paredes celulares y los polímeros, incrementando la disponibilidad de CHS para las bacterias del ensilaje. A este tipo de inoculante le son atribuidas tres ventajas: a) efecto beneficioso en la conservación por incrementos en el contenido de CHS; b) mejora del consumo por acelerar el tránsito de alimentos y c) mejora de los niveles de digestibilidad por hidrólisis de la celulosa del forraje (Arnould, 1981); sin embargo, la deficiencia principal de la inoculación con enzimas es la elevación del contenido de proteína soluble en los ensilajes.

Otros conservantes de acción similar se han utilizado mezclando cereales ricos en almidón y amilasas, lo que facilita la obtención por parte de las bacterias lácticas del almidón hidrolizado, pues estas no son capaces de utilizarlo directamente (Demarquilly, 1979).

Los microorganismos en la fermentación

Contenido de microorganismos del forraje

La flora dominante de la hierba sin cortar está integrada por organismos Gram negativos, heterotróficos, aerobios, cromogénicos, pertenecientes a los géneros *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* y *Xantomonas* (Woolford, 1984; Gouet, 1985). También aparecen los hongos, entre los que se pueden citar como más comunes los de los géneros *Mucor*, *Aspergill* y *Penicillium*. Las levaduras están asociadas al medio ambiente y se detectan pocos géneros: *Candida*, *Hansenula* y

Pichia, de crecimiento superficial, y los de crecimiento en forma de botón como *Torulopsis* (Beck y Groos; Groos y Beck, citados por Weise, 1973). Aparecen también otros géneros como *Endomycopsis* y *Saccharoroyces* y algunos hongos asociados con la hierba, que no pertenecen a la flora típica.

La población de bacterias lácticas es menor que 10 g^{-1} de hierba fresca (Moon, Moon, Ely y Parker, 1981), lo que puede ser consecuencia de la actividad antibiótica de otros componentes de la microflora.

Dentro de las bacterias ácido lácticas encontradas en la hierba fresca aparecen las del tipo heterofermentativas como predominantes; estas son menos eficientes como productoras de ácido que las homofermentativas. Entre 400 aislamientos realizados por Stirling y Whittenbury (1963), el 80% fueron *Leuconostoc*, 10% *Pediococcus* y el resto *Lactobacillus*. Otros autores, sin embargo, encontraron a los *Streptococcus* (homofermentativos) como segundo grupo más numeroso después de la microflora Gram-; mientras que los *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* fueron los menos numerosos (Woolford, 1984).

Los bacilos clostrídicos aparecen en escaso número, se observan como organismos atípicos de la microflora epifítica y resultan contaminantes provenientes del suelo. Además, existen otros microorganismos capaces de crecer en las condiciones de anaerobiosis creadas dentro del ensilaje.

Factores que condicionan la actividad de los microorganismos

Durante el proceso de conservación de los forrajes en forma de ensilaje, los productos metabólicos tienen su origen en el desarrollo simultáneo de muchas especies bacterianas, anaerobias facultativas o estrictas, esporuladas o no, así como en la acción de las enzimas vegetales.

De la microflora presente en el forraje, la composición bioquímica de la especie forrajera y el contenido de MS, así como de las condiciones de temperatura, pH y anaerobiosis que se creen en el silo, va a depender la intensidad de las fermentaciones y su orientación (Gouet, Contrepois, Bousset y Bousset-Fatianoff, 1972).

Para algunos autores (Woolford, 1984; Gouet, Gouet, Luis y Demarquilly, 1984) la microflora de la hierba verde es enteramente diferente, cuantitativa y cualitativamente, de la flora final del ensilaje; en pequeñas concentraciones se encuentran algunas bacterias ácido lácticas (Stirling y Whittenbury, 1963; Weise, 1973) las cuales se introducen en el ensilaje durante las tareas de recolección.

Trabajos realizados por Beck (1978) al inicio de la fermentación, dieron como resultado una relación numérica bastante aproximada entre la cantidad de bacterias lácticas epifíticas y las de un ensilaje joven. Weise (1973) destaca que pueden diferenciarse cinco períodos en el desarrollo de los microorganismos lácticos:

- De la primavera al otoño, donde aumenta el número total de bacterias lácticas y se incrementa también el número de especies.
- En primavera el número de especies es bajo y dominan los bacilos lácticos homofermentativos, productores activos de ácido.
- Hacia el verano las bacterias homofermentativas son reemplazadas por las heterofermentativas.
- Al final del verano son reprimidas las bacterias heterofermentativas por los microorganismos del tipo coco.
- En otoño dominan las bacterias del tipo coco.

Esto puede tener influencia, en cierta medida, sobre la calidad del ensilaje,

teniendo en cuenta que dichos grupos de microorganismos tienen una actividad diferente y distintas necesidades en cuanto a hidratos de carbono.

Para conocer las necesidades de hidratos de carbono hidrolizables de estas bacterias, este mismo autor realizó una experiencia, partiendo de especies epifíticas homo o heterofermentativas, las cuales fueron inoculadas en medio MRS, con contenidos crecientes de glucosa. Como resultado de esta experiencia, se obtuvo que la evolución de los microorganismos fue diferente, no solo por la adición de azúcares, sino por propiedades características de cada especie.

Con el mismo aporte de azúcares, *Lactobacillus plantarum* (homofermentativo) tuvo siempre valores absolutos más elevados en la tasa de crecimiento, seguido por *L. fermenti* (hetero), *L. casei* (homo), *L. buchneri* y *L. brevis*.

Los microorganismos heterofermentativos alcanzaron un número máximo de gérmenes cuando el contenido de glucosa fue de 6%. Los homofermentativos tuvieron diferente comportamiento, pues *L. plantarum* alcanzó su número máximo a 4% de azúcares; mientras que *L. casei* necesitó el 8,5%.

Es importante tener en cuenta además que del comportamiento específico de las bacterias lácticas predominantes, dependerá la rapidez de producción, la cantidad y el tipo de ácido formado como consecuencia del metabolismo de los azúcares.

Sobre la actividad fermentativa de las bacterias intervienen algunos factores entre los cuales pueden mencionarse los siguientes: la temperatura, la disponibilidad de glúcidos solubles fermentescibles, el poder amortiguador, la tasa de MS y la presencia eventual de conservantes (Gouet, 1979).

Temperatura

Tiene un efecto directo, pues actúa sobre la velocidad de crecimiento de las bacterias, y a la vez un efecto selectivo sobre estas.

El desarrollo óptimo de las bacterias clostrídicas se produce a la temperatura óptima de crecimiento de los *Lactobacillus*, que es entre 30 y 40°C (Bergey's Manual, 1974). El crecimiento de los mesófilos (*Lactobacillus* y *Streptococcus*) se produce alrededor de 30°C, mientras que a 20°C solo se encuentran *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*. Los *Pediococcus* son capaces de continuar su desarrollo a 38°C, al igual que algunas especies de *Lactobacillus*.

La temperatura también ejerce influencia sobre la acidificación, que se produce rápidamente a 45°C cuando se ensilan algunos forrajes, pero esta elevación de la temperatura ejerce influencia negativa sobre los glúcidos solubles y favorece el desarrollo de la flora clostrídica. La temperatura óptima se sitúa entonces entre 20 y 30°C, con lo cual se garantiza una anaerobiosis rápida y la estabilización de la masa ensilada (Gouet, 1979).

Contenido de glúcidos solubles

Tanto la cantidad como su disponibilidad favorecen el crecimiento bacteriano, en particular el de las bacterias lácticas, dando origen a la fermentación (Celanie, 1982).

Cuando las condiciones anaeróbicas están bien establecidas en el ensilaje, los azúcares disponibles después que la respiración de la planta y la actividad aeróbica de otros microorganismos ha cesado, dan lugar a una fermentación homoláctica, de acuerdo con el predominio y la abundancia de azúcares en el medio (Woolford, 1984), ya que según Zeikus (1980) las bacterias

homolácticas pueden realizar, en ausencia de cantidades suficientes de azúcares, una fermentación heteroláctica.

Estudios realizados por Weise (1963) mostraron el efecto de diferentes concentraciones de azúcares fermentescibles sobre el crecimiento de las bacterias ácido lácticas, que varió entre las distintas especies.

Capacidad amortiguadora

Las bacterias lácticas resultan sensibles a la disminución del pH y son inhibidas por la acidez que son capaces de crear durante la fermentación, por lo que la capacidad amortiguadora de la acidez de la planta interviene sobre la intensidad del proceso (Gouet, 1979). Es por ello que cuando la capacidad amortiguadora es alta la cantidad de ácido láctico necesario para alcanzar niveles críticos de pH es mucho más elevada.

Existe una estrecha relación entre la capacidad amortiguadora de la planta y el contenido de azúcares, lo cual fue demostrado por Weissbach, Schmidt y Hein (1974), quienes encontraron que a mayor contenido de CHS y menor capacidad amortiguadora, el material ofrecía menos resistencia a la acidificación.

Tasa de materia seca

La MS es importante porque controla las fermentaciones, ya sea a través de la inhibición o retardo del crecimiento clostrídico (Wieringa, 1966), disminuye la actividad fermentativa, sobre todo la producción de ácido acético (Sauvant y Gouet, 1979), e incrementa el consumo (Marsh, 1979).

Zimmer (1974) señaló que las pérdidas de MS en un ensilaje oscilan entre el 7 y el 48% en dependencia de la calidad del proceso. Otros autores han

encontrado pérdidas mucho menores (Webster y Wilson, 1980; Brown y Chavalimu, 1985), adecuadas para ensilajes de calidad.

Cambios en la microflora durante la fermentación

En 1957, Barnet describió las fases que tenían lugar durante el proceso de conservación, definiéndolas de la forma siguiente:

- 1era. Respiración de células vegetales, con producción de CO₂, pérdida de agua y utilización de hidratos de carbono sencillos, debido a procesos bioquímicos y compresión de la masa ensilada.
- 2era. Producción de ácido acético en pequeñas cantidades por organismos grupo coli y otros de fase de corta duración.
- 3era. Inicio de fermentación láctica, por la utilización por parte de los fermentos ácido lácticos (lactobacilos y estreptococos) de los hidratos de carbono.
- 4era. La producción de ácido láctico llega al máximo y permanece constante en 1-1,5% del material fresco, manteniendo un pH constante por debajo de 4,2.

Estas cuatro etapas duran entre 17 y 21 días y si las condiciones del ensilado no son satisfactorias se produce la siguiente etapa.

- 5era. Proliferación de los organismos productores de ácido butírico a partir de los hidratos de carbono y del ácido láctico ya formado. Esto se acompaña, en casos extremos, de una desaminación de aminoácidos con formación de ácidos grasos más volátiles, amoníaco, aminas y CO₂.

Más tarde, Gouet (1979) plasmó gráficamente la secuencia de los microorganismos en la fase inicial de la conservación.

La mayor parte de las especies presentes sobre el forraje verde se desarrollan, pero debido a sus características aerobias y sensibilidad a pH bajos desaparecen las *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, coliformes y los *Streptococcus* entre los 2 ó 3 días, siempre que se establezcan las condiciones para ello. Las especies bacterianas más importantes que se desarrollan están incluidas en tres grupos fisiológicos y las más beneficiosas para la fermentación son las bacterias ácido lácticas homofermentativas. Este grupo alcanza concentraciones de 10⁹ ufc/ml hacia los 2 días del proceso, manteniéndose a ese nivel durante una o 2 semanas. La evolución de los clostridios se produce en dependencia de las características del forraje ensilado y de la calidad de la fermentación.

La secuencia regular de los eventos se produce así: multiplicación de las bacterias coliformes hasta el séptimo día aproximadamente, que decrecen en número posteriormente al ser desplazadas por los cocos lácticos (*Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, los cuales son reemplazados por un crecimiento lento de los lactobacilos y más alta producción de ácido láctico. La reducción de las coliformes es una buena medida de la acidificación del medio y de la estabilidad del ensilaje (Weise, 1968). Es posible que los *Pediococcus* no sean totalmente sustituidos por los *Lactobacillus* como otros cocos lácticos, pero sí dejan de ser dominantes en la masa ensilada.

Estos cambios son originados por el poder de supervivencia de los diferentes grupos de microorganismos y no por la rapidez de crecimiento de un grupo con relación al otro, lo que está ligado a la

ácido-tolerancia y acidificación potencial de cada género. Generalmente los *Pediococcus* son más tolerantes al ácido que otras bacterias ácido lácticas, lo que parece ser la causa de su permanencia en el ensilaje después de otros cocos (Woolford, 1984).

Las bacterias ácido lácticas pueden alcanzar de 10^9 - 10^{10} ufc/g de peso fresco y constituyen una proporción elevada del número total de viables.

Una posible razón de los cambios cualitativos que se producen durante los primeros estadios de la conservación, es el antagonismo entre las bacterias ácido lácticas y el resto de las bacterias, las transformaciones del medio ambiente (aerobiosis o anaerobiosis) y el grado de tolerancia a la acidez que presentan los diferentes grupos bacterianos.

Al transcurrir pocas semanas, la cantidad de bacterias refleja escasamente el estado de preservación del ensilaje; el pH pasa a jugar un papel preponderante, el que debe predecir el futuro desarrollo de la microflora. No obstante, se ha comprobado que las bacterias ácido lácticas son capaces de producir gran cantidad de ácido después de haber cesado su crecimiento e incluso cuando su población está en fase de declinación (Gibson, Stirling, Keddle, Rosenberger, 1958; Langston, Bouma y Conner, 1962).

El momento en que puede comenzar el crecimiento clostrídico es impredecible, ya que depende de diferentes características físicas y químicas, entre las que desempeña un importante papel el contenido de MS del forraje, que ha sido anteriormente mencionado. Los clostridios, por ser bacterias estrictas esporuladas, pueden permanecer en la masa ensilada en forma de esporas hasta que las condiciones sean propicias para su desarrollo (Woolford, 1984).

Las especies de clostridios que con más frecuencia aparecen sobre el ensilaje son *Clostridium butyricum* y *C.*

tyrobutyricum, los cuales fermentan el lactato, y las especies proteolíticas que son *C. sporogenes*, *C. bifermentans* y *C. perfringens* (Gouet y Bergere, 1973).

Aunque generalmente los *Clostridium* se desarrollan en la parte secundaria o terminal de la fermentación, unidos a las bacterias lácticas pueden proliferar en los primeros días de almacenaje a temperaturas entre 22 y 40°C (Gibson *et al.*, 1958); ello puede hacer posible que, en presencia de pequeñas cantidades de ácido butírico, ocurra una buena preservación láctica del ensilaje.

La principal causa del deterioro del ensilaje es la fermentación del lactato a butirato y la actividad proteolítica de los clostridios.

En la masa ensilada hay otros microorganismos como los bacilos, bacterias propiónicas y levaduras, que se desarrollan y compiten con las bacterias ácido lácticas por el sustrato, sin que se vea amenazada la estabilidad del ensilaje (Woolford, 1977), siempre que no sean dominantes dentro del proceso fermentativo y las bacterias ácido lácticas logren llevar el peso de la fermentación.

Clasificar un ensilaje como bueno o malo, de acuerdo con el contenido de microorganismos, no es fácil, pues se han encontrado ensilajes de calidad con baja concentración de bacterias ácido lácticas y viceversa (Lanaston *et al.*, 1958). Así mismo, tanto en buenos como en malos ensilajes, se puede encontrar una población similar de bacterias lácticas (Ohyama, Masaki y Morichi, 1973).

En ensilajes deteriorados se encuentran incrementados los clostridios, sobre todo los del tipo sacarolítico (Langston *et al.*, 1958).

Langston y Bouma (citados por Woolford, 1984) encontraron que los

ensilajes tenían mayor calidad cuando la flora inicial estaba compuesta por bacterias ácido lácticas del tipo coco y no pudieron explicar la aparente dominancia de los lactobacilos poco productores de ácido en los ensilajes de mala calidad.

Se han desarrollado pocos estudios sobre la flora microbiana de los ensilajes, fundamentalmente en la zona tropical, pero indudablemente, la importancia de la misma en la conservación indica la necesidad de un estudio más detallado que conduzca a su mejor manipulación para garantizar una mayor eficiencia en el proceso fermentativo.

1 mol de glucosa \rightarrow 2 moles de ácido láctico

1 mol de fructosa \rightarrow 2 moles de ácido láctico

1 mol de pentosa \rightarrow 1 mol de ác. láctico + 1 de ác. acético + 1 de ác. láctico

En este subgrupo se encuentran principalmente *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *Pediococcus faecalis*, etc.

La fermentación homoláctica se produce por la vía de Embden-Meyerhoff-Parnass (Wood, 1961).

1 mol de glucosa \rightarrow 1 ác. Láctico + 1 etanol + 1 CO₂

3 fructosa \rightarrow 1 ác. Láctico + 1 manitol + ác. acético + 1 CO₂

1 pentosa \rightarrow 1 ác. acético + 2 de ác. láctico

Los microorganismos más representativos son *Lactobacillus brevis* y *Leuconostoc*.

La vía metabólica más utilizada es de las pentosas monofosfato (Word, 1961).

Los ácidos orgánicos que se encuentran en las gramíneas en cantidades de 20 a 60 g kg⁻¹ de MS, donde predominan el ácido cítrico y el málico, pueden ser utilizados por las bacterias ácido lácticas homo o heterofermentativas por diferentes vías; se obtienen diferentes productos metabólicos como lactato, acetato,

Metabolismo de las especies bacterianas dominantes

El grupo de las bacterias ácido lácticas dominantes se puede dividir para su estudio en dos subgrupos (Gouet, 1979): homofermentativas y heterofermentativas, los cuales están integrados por diferentes especies o tipos.

Homofermentativas. Fermentan las hexosas a ácido láctico con un rendimiento elevado y como consecuencia disminuyen rápidamente el pH, por lo que constituyen el grupo más importante. La fermentación se produce a través de la siguiente ecuación:

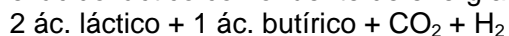
Heterofermentativas. Tienen un rendimiento de la fermentación láctica netamente inferior y los pH son más elevados.

etanol, 1 CO₂, etc. (Wooldford, 1984), lo que representa desde el punto de vista de la fermentación una pérdida de carbohidratos solubles y de MS.

El grupo de los clostridios está compuesto a su vez por dos subgrupos (Gouet, 1979).

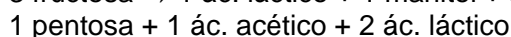
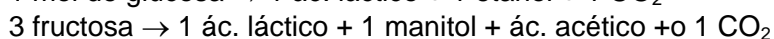
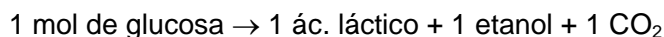
Subgrupo de los "butíricos". Compuestos por diferentes especies; las más frecuentes en el ensilaje son *Clostridium butyricum* y *Clostridium tyrobutyricum*, ambos de origen telúrico, anaerobios estrictos, esporulados, sensibles a pH inferior a 5,0. Estos

microorganismos son capaces de utilizar el ácido láctico como fuente de energía.



Estas especies no son proteolíticas y no producen amoníaco, pero su nocivi-

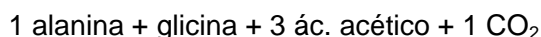
dad en el ensilaje se relaciona con la producción de ácido butírico, que eleva y favorece la proliferación de los proteolíticos.



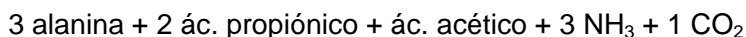
Subgrupo de los proteolíticos. Compuesto por muchas especies como *Clostridium sporogens*, *C. perfringes* y *C. bifermentans*, los que son anaerobios estrictos, esporulados, sensibles a pH, de origen telúricos. Ellos no fermentan el

lactato, pero si hidrolizan las proteínas y los péptidos en forma activa, descarboxilan y desaminan los aminoácidos y producen ácido acético y butírico, amoníaco, ácidos de hidrógeno, hidrógeno sulfuroso y aminas.

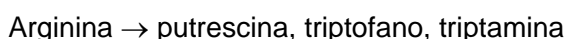
Reacción de oxidación - reducción



Reacción de desaminación



Reacción de descarboxiación



Durante la conservación debe tenerse en cuenta el papel que juegan las enzimas de la planta en la solubilidad de las proteínas, que son llevadas hasta péptidos y aminas, pero sin la formación de amoníacos.

Cultivos bacterianos de cepas lácticas

La flora epifítica presente sobre el forraje generalmente está compuesta por un número elevado de microorganismos aerobios y de pocas bacterias ácido lácticas, por lo que el desarrollo de bacterias deficientes en cuanto a la producción de ácido láctico en el proceso de ensilaje es una vía lógica para garantizar la dominancia de estas

(Bolsen, 1984) sugirió que es preferible utilizar mezclas de estos géneros que uno solo.

No todas las bacterias ácido lácticas pueden ser utilizadas con este fin, puesto que para ello debe seleccionarse un microorganismo con un potencial tal que pueda brindar resultados satisfactorios.

En 1961, Whittenbury (citado por Bolsen, 1987) recopiló datos que le permitieron señalar las características que debía reunir una bacteria para ser utilizada como inoculante biológico; ella son:

1. Alta velocidad de crecimiento, lo que le facilitará dominar sobre otros microorganismos que aparecen en los ensilajes.

2. Debe ser homofermentativa.
3. Ser tolerante a la acidez y producir un pH final de 4,0 o cercano a este valor.
4. Debe fermentar la glucosa, fructosa, sacarosa y preferiblemente fructosanos, los cuales aparecen durante el ensilaje.
5. No debe producir dextrana a partir de la sacarosa o manitol a partir de la fructosa.
6. No debe tener acción sobre los ácidos orgánicos.
7. Crecimiento a temperatura superior a los 50°C para evitar su muerte por efecto del calentamiento inicial, provocado por los microorganismos aeróbicos.
8. Debe crecer en material de bajo contenido de humedad.

Otras propiedades consideradas como importantes incluyen la habilidad de la bacteria para utilizar polímeros, no tener actividad proteolítica, resistencia a fagos, ser activa aeróbica y anaeróbicamente, buena estabilidad de almacenaje y estabilidad genética.

La fermentación láctica favorece el ensilaje, debido a que conserva la energía en la transportación de los azúcares y genera una fermentación más eficiente por utilizar estas bacterias la vía de la fosfoenolpiruvato con menos gastos de ATP y realizar a la vez el transporte de los azúcares dentro de la célula y la fosforilación (O'Leary, 1987).

Sobre el uso de las bacterias ácido lácticas como inoculante biológico se han realizado muchas experiencias que indican que a pesar de que se produce una caída del pH y hay una fermentación más eficiente, no en todos los casos se obtienen resultados satisfactorios. Esto está relacionado, en primer lugar, con la población elevada de bacterias ácido lácticas al introducirse el forraje en el silo; en segundo lugar con los niveles de inoculación, que pueden ser bajos para dominar a la microflora normal; y tercero,

que en muchos casos los extractos bacterianos no han sido los más beneficiosos en condiciones experimentales. Sin embargo, los inoculantes biológicos son utilizados, puesto que se manifiestan como unos de los más ventajosos por su bajo costo y seguridad de manejo y aplicación; además, no presentan problemas residuales y se emplean en pequeñas cantidades (Bolsen, 1987).

McCormik (1987) señaló que la baja eficiencia de los inoculantes bacterianos está vinculada con: 1) carencia de un sustrato adecuado para la proliferación de bacterias introducidas, 2) bacterias no viables, 3) competencia por parte de las bacterias heterofermentativas salvajes y 4) población inadecuada de bacterias homofermentativas indígenas.

Experiencias realizadas por Gouet (1985) al inocular cepas lácticas conocidas en dos forrajes diferentes, demostraron que la inoculación masiva las sitúa en posición dominante para el uso de sustrato, lo cual puede limitar la proteólisis, acelerar la desaparición de especies gasógenas y productoras de amoníaco, disminuir la velocidad de desarrollo de los bacilos heterofermentativos e inhibir los clostridios. El número mínimo de células a inocular fue fijado en 10^5 ufc de forraje y la forma líquida o rehidratada asegura una adaptación y un crecimiento más rápido de las células que cuando se usa el medio seco.

Vogel (1983) probó la eficacia de un grupo de aditivos de fabricación comercial y cultivos frescos sobre la conservación de alfalfa/dactil, con un contenido de MS de 16% y difícil de ensilar, y obtuvo como resultado que en la mayoría de los casos se disminuyó el contenido de ácido butírico y la producción de ácidos grasos, así como la producción de nitrógeno amoniacal.

Por otra parte, fueron también utilizados 7 aditivos de bacterias lácticas de producción comercial, que contenían

diferentes ingredientes activos (bacterias solas o mezcladas y enzimas) con este mismo fin, y se concluyó que los inoculantes comerciales de bacterias ácido lácticas pueden influir sobre los patrones fermentativos durante el ensilaje, aunque no alcanzan la eficiencia del ácido fórmico en la reducción de los niveles de productos indeseables como el acetato y el nitrógeno amoniacal (Henderson y McDonald, 1984).

El lactisil, producto comercial de inoculante biológico, fue utilizado en ensilaje de remolacha fresca y se obtuvieron buenos resultados, ya que disminuyó las pérdidas por fermentación y aumentó el contenido de compuestos nitrogenados digestibles y de almidón (Prikryl, Barancic, Mackova y Jakobe, 1981).

En la EEPF "Indio Hatuey" fue utilizado el lactisil como inoculante biológico en un ensilaje de *Pennisetum purpureum* (Luis, Ojeda y Ramírez, 1986); desde el punto de vista bioquímico los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó además miel al 2%, lo que se manifestó en una reducción del pH, mayor concentración de ácido láctico, menor contenido de nitrógeno amoniacal y cantidades insignificantes de ácido butírico.

Iguales resultados se observaron en el consumo de MS y de materia seca digestible (CMSD), mientras que la digestibilidad de la MS (DMS) y el nivel de alimentación no mostraron diferencias significativas por efecto de los tratamientos (Ojeda, Esperance, Luis y Cáceres, 1987).

La inoculación de bacterias ácido lácticas obtenidas en el laboratorio de microbiología de la EEPF "Indio Hatuey", en ensilajes tropicales, provocó un incremento en el contenido de bacterias ácido lácticas y una disminución en el contenido de bacterias entéricas y levaduras, lo que incidió en forma positiva sobre los indicadores fermenta-

tivos; pH, $\text{NH}_3\text{-N}$ y ácido butírico (Luis, Lissette, resultados no publicados).

De forma similar, hubo un incremento significativo del consumo de MO, PB y FB y de nutrimentos: MSD, EM y PBD, cuando se adicionó *Pediococcus acidilactici* a los forrajes conservados (Luis, Lissette, resultados no publicados).

CONCLUSIONES

La flora epifítica del forraje, por estar compuesta por microorganismos fundamentalmente aerobios, no garantiza una microbiota eficaz para la conservación, por lo que la introducción de bacterias ácido lácticas a la hora de confeccionar los ensilajes, debe facilitar una fermentación eficiente del material almacenado.

Debido a que existen diversos factores que afectan el desarrollo microbiano, tiene importancia vital crear las condiciones apropiadas de humedad, temperatura, concentración de carbohidratos solubles y otros nutrientes, para garantizar un crecimiento rápido y estable de la microflora dominante, que debe corresponderse con la que mayor cantidad de ácido láctico produzca, por ser este ácido el que garantiza una mayor y rápida acidificación del medio.

No todas las bacterias ácido lácticas pueden ser utilizadas como inoculante biológico, sino solo aquellas que cumplan con los requisitos establecidos para ello.

El uso de aditivo biológico es aún un aspecto debatido ampliamente, debido a los múltiples factores que inciden en el éxito de su utilización, por lo que se hace necesario profundizar su estudio y aplicación en la fabricación de ensilajes tropicales.

CONCLUSIONS

The epiphytic flora of forage is mainly composed by aerobic micro-organisms,

for that reason the optimum microbial medium for conservation is not available. Therefore, the efficient fermentation of the stored material should be increased if lactic acid bacteria are used for making silages.

It is essentially important to create the suitable conditions of humidity, temperature, concentration of soluble carbohydrates and other nutrients, in order to provide a rapid and stable growth of the dominant flora because there are many factors which affect the microbial development. The best flora will be that of higher lactic acid production as this acid facilitates the greater and faster acidification of the medium.

All lactic acid bacteria can not be used as biological inoculators but only those which have the adequate required conditions.

The use of biological additives is yet a topic of wide discussion because many factors influence upon the successful utilization of them; it is necessary, therefore to make profound studies on the application of this additive for making tropical silages.

REFERENCIAS

- ARNOULD, R. 1981. *Revue de l'Agriculture*. 34:755
- ARNOULD, R. & MOREELS, A. 1976. *Revue de l'Agriculture*. 29:67
- BARNETT, A.J.G. 1957. Fermentación del ensilado. Aguilar, Madrid. 257 p.
- BECK, Th. 1978. The microbiology of silage fermentation. In: Fermentation of silage - A review. K.E. McCullough, ed. Nat. Feed Ingredients Assoc. West Des Moines, Iowa. p. 62
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 1974. Eight edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA
- BOLSEN, K.K. 1987. New technology in forage conservation-feeding systems. In: Biotechnology in the Feed Industry. Edited by T. Pearse. Lyons. p. 257
- BROWN, D.L. & CHAVALIMU, E. 1985. *Animal Feed Science and Technology*. 13:1
- CELANIE, E. 1982. Etude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne à sucre, de sorgho et de pangola en climat tropical humide. Tesis presentada para la obtención del Diploma de Doctor de 3er. ciclo. Université Pierre et Marie Curie. Paris
- DEMARQUILLY, C. 1979. Classification des conservateurs actuels, évolution probable. In: La conservation des ensilages. Journée CAAA. INA-Paris-Grignon. p. 1
- ESPERANCE, M. 1981. Utilización del ensilaje para la producción de leche. Tesis presentada en opción al grado de C.Dr. Ciencias. ISAICC. Matanzas, Cuba
- ESPERANCE, M. & DÍAZ, D. 1985. *Pastos y Forrajes*. 9:297
- GIBSON, T.; STIRLING, A.C.; KEDDIE, R.M. & TOSENBERGER, R.F. 1958. *J. Gen. Microbiol.* 19:112
- GOUET, Ph. 1979. Les bacteries des ensilages. In: La conservation des ensilages. Journée CAAA. INA-Paris-Grignon. p. 18
- GOUET, Ph. 1985a. Silage: new biological aspects. Symposium Santé Animale. SANOFI, Francia, p. 35
- GOUET, Ph. 1985b. La microbiology des ensilages. Lab. de Microbiologie. INRA-CRZV de Theix, Francia
- GOUET, Ph. & BERGERE, L.J. 1973. *Fourrages*. No. 56, p. 89

- GOUET, Ph., CONTREPOIS, M.; BOUSSET, J. & BOUSSET-FATIANOFF, NATHALIE. 1972. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 12:159
- GOUET, Ph.; GOUET, JOSETTE; LUIS, LISSETTE & DEMARQUILLY, C. 1984. Effects de l'inoculation des ferments lactiques sur la conservation d'ensilage de Dactyl. CRZV. Theix, Francia. EEPF "Indio Hatuey". Cuba (Mimeo)
- HENDERSON, A.R. & McDONALD, P. 1984. **Research and development in agriculture**. 1:171
- LAMPILA, M.; JAAKKOLA, S.; TOIVONEN, V. & SETALA, J. 1988. Forage conservation and supplementation in cattle rations. Proc. VI World Conference on Animal Production, Helsinki. p. 51
- LANGSTON, C.W.; BOUMA, CECELIA & CONNER, R.M. 1962. **J. Dairy Sci.** 45:618
- LUIS, LISSETTE; OJEDA, F. & RAMIREZ, MARISOL. 1986. **Pastos y Forrajes**. 9:278
- MCCORMICK, E.M. 1987. Effect of sil-All-A biological silage inoculant - on Ryegrass. In: Biotechnology in the Feed Industry. Edited by T. Pearse. Lyons. p. 283
- MARS, R. 1979. **Grass and Forage Science**. 34:1
- MOON, NANCY J.; MOON, L.C.; ELY, L.O. & PARKER, J.A. 1981. **J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 13:248
- OHYAMA, Y.; MASAKI, S. & MORICHI, T. 1973. **Jap. J. Zootechn. Sci.** 44:59
- OJEDA, F.; ESPERANCE, M.; LUIS, LISSETTE & CACERES, O. 1987. **Pastos y Forrajes**. 10:256
- O'LEARY, J. 1987. Inoculants for silage. In: Biotechnology in the Feed Industry. Edited by T. Pearse. Lyons. p. 211
- PRIKRYL, J.; BARANCIC, F.; MACKOVA, M. & JAKOBE, P. 1981. **Zivocisna Vyroba**. 26:783
- SAUVANT, D. & GOUET, Ph. 1979. Les relations entre les processus fermentaires: consequence pour l'apreciation quantitative de la qualité de la conservation. In: La conservation des ensilages. Journée CAAA. INA-Paris-Grignon. p. 41
- STIRLING, ANNA C. & WHITTENBURY, R. 1963. **Journal of Applied Bacteriology**. 26:86
- VOGEL, P. 1983. Efficacité comparee des conservateurs d'ensilage. Journée de Grangeneuve. FAG/SRVA. p. 1
- WALDO, D.R. 1977. **J. Dairy Sci.** 60:306
- WEBSTER, C.C. & WILSON, P.N. 1980. Agriculture in the tropics. Second Edition. Longman Group, London. 640 p.
- WEISE, F. 1968. **Das Wirtschaftseigene Futler**. 14:294
- WEISE, F. 1973. Formation d'acide et utilisation des sucres par les Lactobacillus provenant des ensilages. Landbauforschung Wolkenrode, 23. Jahrgang. Helfut 1 Seite. 71-77
- WEISSBACH, F.; SCHMIDT, I. & HEIN, E. 1974. Method of anticipation of the rum of fermentation in silage making, based on the chemical composition of green fodder. Proc. XII Int. Grassld. Cong., Moscow. p. 663
- WIERINGA, G.W. 1966. The influence of nitrate on silage fermentation. Proc. 10th Int. Grassld. Cong., Helsinki, p. 191
- WOOD, W.A. 1961. Fermentation of carbohydrates and related compounds. In: The bacteria. (I.C. Gusalus & R.Y. Stainer, Eds.). Academic Press, New York. p. 125
- WOOLFORD, M.K. 1977. **J. appl. Bacteriol.** 43:447

WOOLFORD, M.K. 1984. The silage fermentation. Grassland Research Institute, Hurley, Berkshire, UK. p. 85
YOUNG, J.F. 1978. Silage and hay additives-value for money? College Digest, North of Scotland College of Agriculture. Aberdeen, UK. p. 19

ZEIKUS, J.G. 1980. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:423

ZIMMER, E. 1974. Theory and practice of fodder conservation. Proc. XII Int. Grassld. Cong., Moscow. p. 176

Recibido el 10 de junio de 1991