



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias

**Efecto de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* en los
parámetros fermentativos de un ensilaje de sorgo
forrajero con lactosuero**

Tesis

Que para obtener el grado de
Ingeniero Agroindustrial

Presenta

Elizabeth Mérida Lira

Dirección:
Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Asesores:
Dra. Irma Caro Canales
Dr. Martín A. Meza Nieto
M.B. Diana Jaqueline Pimentel González

Tulancingo, Hgo. Enero 2007

ÍNDICE

ÍNDICE	II
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	VII
RESUMEN	VIII
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	
1.1 El Ensilado	3
1.1.1 El proceso de ensilaje	4
1.1.2 Factores que afectan el ensilado	13
1.1.3 Aditivos y suplementos utilizados en los ensilados	15
1.1.3.1 Características del lactusero utilizado como aditivo	17
1.1.3.2 Bacterias ácido lácticas usadas como aditivos en el ensilaje	20
1.1.3.2.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	20
1.2 El sorgo forrajero	21
2. ANTECEDENTES	
2.1 Viabilidad de BAL en forraje fresco	23
2.2 Ácidos orgánicos y pH en ensilados con BAL	24
2.3 Carbohidratos hidrosolubles en ensilados con BAL	27
3. JUSTIFICACIÓN	31

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1	Hipótesis	32
4.2	Objetivos	
4.2.1	Objetivo General	32
4.2.2	Objetivos Específicos	32

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1	Materiales	33
5.2	Localización del experimento	33
5.3	Diseño de experimentos	34
5.4	Condiciones de operación de los biorreactores	34
5.5	Extracciones	35
5.6	Análisis microbiológicos	36
5.7	Determinación de ácidos orgánicos	36
5.8	Determinación de carbohidratos totales	37

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1	Análisis microbiológicos	39
6.2	Medición de pH	41
6.3	Determinación de la concentración de ácidos orgánicos	42
6.4	Concentración de carbohidratos hidrosolubles	44

7. CONCLUSIONES	46
------------------------	-----------

8. RECOMENDACIONES	47
9. REFERENCIAS	48
10. ANEXOS	53
Anexo 1. Análisis estadístico de la prueba T de student para los resultados obtenidos de carbohidratos totales durante la fase experimental.	53
Anexo 2. Análisis estadístico con la prueba T de student para los resultados obtenidos de la medición de pH durante la fase experimental.	54
Anexo 3. Análisis estadístico con la prueba T de student para los resultados obtenidos de la medición de ácido láctico durante la fase experimental.	55
Anexo 4. Análisis estadístico con la prueba T de student para los resultados obtenidos de la medición de ácido acético durante la fase experimental.	56
Anexo 5. Análisis estadístico con la prueba T de student para los resultados obtenidos de la medición de ácidos orgánicos totales, durante la fase experimental.	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición media del lactosuero.	17
Cuadro 2. Viabilidad de BAL en forraje fresco.	24
Cuadro 3. Metabolitos derivados de la fermentación y pH en ensilados con BAL.	26
Cuadro 4. Carbohidratos hidrosolubles en ensilados con BAL.	30
Cuadro 5. Bacterias mesófilas de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inóculo con la bacteria <i>L. rhamnosus</i> .	39
Cuadro 6. Bacterias lácticas de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inóculo con la bacteria <i>L. rhamnosus</i> .	40
Cuadro 7. Enterobacterias de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inóculo con la bacteria <i>L. rhamnosus</i> .	40
Cuadro 8. pH a diferentes tiempos de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inóculo con la bacteria <i>L. rhamnosus</i> .	41
Cuadro 9. Concentración de ácido láctico y ácido acético en un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inóculo con la bacteria <i>L. rhamnosus</i> .	43
Cuadro 10. Concentración de ácidos orgánicos totales de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inóculo con la bacteria <i>L. rhamnosus</i> .	43
Cuadro 11. Azúcares totales de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inóculo con la bacteria <i>L. rhamnosus</i> .	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Homofermentación de las bacterias ácidolácticas.	10
Figura 2. Heterofermentación de las bacterias ácidolácticas.	11
Figura 3. Ruta de fermentación de glucosa de <i>L. rhamnosus</i> .	20
Figura 4. Sorgo Forrajero (<i>Sorghum bicolor</i>) donado por el Rancho Universitario.	33
Figura 5. Biorreactores de laboratorio utilizados en la fase experimental.	35
Figura 6. Equipo de Electroforesis Capilar Beckman Coulter.	37
Figura 7. Curva patrón de Azúcares Totales.	38

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

L	Litro
mL	mililitro
° C	grados Celsius
pH	Potencial Hidrógeno
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
MS	Materia seca
%	Porcentaje
ATP	Adenosin Trifosfato
ADP	Adenosin Difosfato
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
L (+)	Levogiro
UFC	Unidad Formadora de Colonia
Kg	Kilogramo
cm	Centímetro
g	gramo
µm	Micrometro
UV	Ultravioleta
nm	Nanometro
mM	milimolar
M	Molar
mg	miligramo
NAD ⁽⁺⁾	Dinucleotido de nicotinamina y adenina
NADH	Dinucleotido de nicotinamina y adenina hidrogenado

RESUMEN

El presente trabajo propone la producción de un ensilado de sorgo forrajero (*Sorghum bicolor*), utilizando lactosuero y una bacteria ácido láctica; *L. rhamnosus*, como aditivos del ensilaje, como una alternativa para el aprovechamiento del lactosuero proveniente de la elaboración del queso tipo Oaxaca, producido en el Valle de Tulancingo, Hidalgo.

Para la elaboración de los biorreactores, se utilizó forraje de sorgo troceado; se utilizó lactosuero ácido donado por la eEmpresa Prounilac, y cultivo liofilizado de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus rhamnosus* Holdbac de Danisco. Se probaron dos tratamientos, con cinco repeticiones, a cuatro tiempos diferentes (0, 30, 60 y 90 días), los cuales consistieron en utilizar forraje de sorgo proveniente de un solo corte. Un tratamiento consistió de la adición de lactosuero ácido estéril y al otro tratamiento se le agregó lactosuero ácido inoculado con la bacteria ácido láctica *L. rhamnosus*.

Finalmente se llevaron a cabo diferentes análisis para determinar: la viabilidad de las bacterias ácido lácticas (microbiológicos), los metabolitos obtenidos de la fermentación heteroláctica de *L. rhamnosus* (ácidos orgánicos por electroforesis capilar), y los carbohidratos hidrosolubles (método de antrona). Los resultados obtenidos fueron analizados, utilizando la prueba T de student ($\alpha = 0.05$), la cual fue usada para comparar los valores de los dos tratamientos, con ayuda del paquete estadístico NCSS versión 6.03

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que el uso de *Lactobacillus rhamnosus* como inoculante en ensilado de sorgo bicolor, no tuvo diferencias significativas ($p > 0.05$), ya que el lactosuero ácido utilizado como agente aditivo, contenía un gran número de bacterias lácticas nativas, en cantidades suficientes para llevar a cabo todo el proceso de fermentación, durante en período de ensilaje.

INTRODUCCIÓN

La conservación de alimentos en forma de ensilaje es una herramienta de manejo que permite a los productores equiparar recursos alimenticios (forrajes, residuos de cosecha, productos agroindustriales) con demanda alimenticia para el ganado lechero. La función básica de la manufactura del ensilaje es almacenar y conservar alimento para su uso posterior con mínimas pérdidas de calidad nutricional (Vanbelle y Bertin 1985).

La adecuada conservación del ensilado depende de la fermentación controlada del forraje verde en el silo; la regulación precisa de la aportación de aire y de la temperatura, es de gran importancia para la obtención de un forraje altamente nutritivo. Es posible añadirle una serie de aditivos o nutrientes como lactosuero, almidones y azúcares, durante la fermentación, tanto para acelerar el proceso, como para aumentar el valor nutritivo del producto (Filya, 2003 a)

A medida que el silo es llenado, cada carga de forraje fresco cortado es compactada para expulsar tanto aire como sea posible de la masa del ensilaje. La ausencia de oxígeno permite a las bacterias ácido lácticas crecer gracias a la conversión de azúcares en ácido láctico. Conforme las bacterias ácido lácticas crecen, el ácido láctico se acumula en la masa ensilada, la acidez se incrementa. A medida que el pH baja, las acciones degradantes de las enzimas vegetales y de las bacterias indeseables (enterobacterias principalmente) levaduras y hongos son frenadas. Cuando el pH es lo suficientemente bajo, la mayoría de las enzimas de degradación son inhibidas y también el crecimiento de microorganismos (Colombatto *et al.*, 2004).

El empleo de bacterias ácido lácticas al ensilado en forma de inoculantes, está destinado a asegurar una rápida y vigorosa fermentación que resulta en una pronta acumulación de ácido láctico y valores bajos de pH a etapas más tempranas del ensilado, con lo cual se mejora la conservación del forraje (Cai *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2002). Por ejemplo, *Lactobacillus buchneri* solo o en combinación con *L. plantarum* es un efectivo agente protector de los ensilados de trigo, sorgo y maíz contra el ataque de levaduras y mohos del aire, bajo condiciones de laboratorio, especialmente en climas cálidos (Adesogan *et al.*, 2003; Filya, 2003b; Holzter *et al.*, 2003).

El lactosuero es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración de queso. Se obtiene tras la separación de las proteínas, llamadas caseínas, y de la grasa (Spreer, 1991). Ese líquido constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de sus compuestos que son solubles en agua. La composición química del suero varía dependiendo de las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso y su pH oscila entre 5 – 6.

Con base en lo anterior expuesto, el objetivo del presente trabajo fue la producción de ensilado a base de sorgo (*Sorghum bicolor*), usando lactosuero proveniente de la elaboración del queso tipo Oaxaca, producido en el Valle de Tulancingo y *Lactobacillus rhamnosus* como aditivos del ensilado, dando una alternativa para el reuso de lactosuero ácido.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 El Ensilado

El ensilado de forraje verde es una manera tradicional de conservar el alimento para los animales y su proceso es de gran importancia para reemplazar la producción y la alimentación directa de forraje verde. La tecnología es simple e incluye la compresión del forraje troceado, seguido de la expulsión de oxígeno. Subsecuentemente, las bacterias ácido lácticas convierten los carbohidratos en ácido láctico. En la actualidad, el uso de cultivos iniciadores incrementa la producción de alimento de alta calidad y asegura que el pH descienda rápidamente para prevenir el crecimiento de microorganismos indeseables, como los clostridios. A medida que el pH desciende, las acciones degradantes de las enzimas vegetales y de los microorganismos indeseables son frenadas; cuando el pH es lo suficientemente bajo (pH 3.8 – 4.2 en el ensilaje de maíz y pH de 4.2 – 4.7 en el ensilaje de alfalfa) (Cherney *et al.*, 2004).

Después de que son abiertos los silos, el aire penetra en la masa ensilada y promueve el crecimiento de microorganismos aerobios ácido tolerantes y la oxidación de los productos de la fermentación se hace presente. Este deterioro aerobio puede causar pudrimiento del ensilado desarrollándose potenciales sustancias tóxicas o microorganismos indeseables. La estabilidad del ensilado contra el deterioro aeróbico (estabilidad aeróbica) puede variar dramáticamente. De cualquier manera, el mecanismo que previene el deterioro aerobio todavía no está bien comprendido (Danner *et al.*, 2003)

Según Ashbell *et al* (2001), los silos adecuados para investigaciones de laboratorio, es el que se hace en bolsas de plástico, donde se obtiene ensilado de buena calidad que puede ser utilizado por los pequeños ganaderos; las bolsas no necesitan cerrarse herméticamente y la preservación es debida al ácido láctico y al ácido acético que inhiben el desarrollo de microorganismos indeseables, y la permeabilidad del oxígeno a través de las bolsas no es un factor importante que influya en la calidad del ensilado. También pueden usarse microsilos cuyo tamaño de muestra varia desde los 50 g hasta los 1000 g, que aunque pueden ser sellados al vacío los resultados más apegados a los parámetros de fermentación a nivel de campo son con microsilos cerrados sin vacío (Cherney *et al.*, 2004; Colombatto *et al.*, 2004 a, b).

En general, los cultivos más comunes para ensilar son la planta entera de maíz, alfalfa y varios pastos, otros menos frecuentes son el trigo, sorgo y diferentes leguminosas (Weinberg y Ashbell, 2003). La materia prima depende de cada país y los recursos propios de este (Cai *et al.*, 1999).

En lugares donde el cultivo de maíz no es propicio, los ensilados de sorgo son una buena opción, ya que proporcionan buenos rendimientos y tienen una buena fermentación ruminal (Abdelhadi y Santini, 2006).

1.1.1 El proceso de ensilaje

A medida que un forraje es cosechado, cortado y almacenado, ocurren pérdidas inevitables en materia seca y calidad nutricional. Estas pérdidas son debidas a enzimas que degradan la planta luego del corte. Las enzimas pueden originarse desde la misma planta que esta muriendo o por bacterias y otros microorganismos. Por lo tanto el objetivo del ensilaje es detener estas reacciones enzimáticas para minimizar pérdidas de energía, proteína y otros nutrientes. Por lo que, el ensilaje puede definirse simplemente como un método e conservación de forraje en el cual la mayoría de las proteínas, energía (carbohidratos fermentables)

y otros nutrientes que se encontraban originalmente en la planta, permanezcan en tal forma que puedan ser utilizados eficientemente por vacas (Ritchie *et al.*, 1972).

Para este proceso hay que cosechar el cultivo en el tiempo adecuado de madurez, secarlo hasta asegurarse de que el contenido de materia seca sea el adecuado para que se efectúe la fermentación ácido láctica en estado sólido (Jonhson *et al.*, 1999; Moss *et al.*, 2001; Filya, 2003 a; Weinberg y Ashbell, 2003).

El estado de madurez del forraje al tiempo de ensilar influye drásticamente en el valor nutritivo del mismo, para lograr un buen ensilado se requiere cosechar el cultivo con un 30 – 35 % de materia seca, con ello se logra una mayor producción y disponibilidad de nutrientes, aunque no en todos los casos (Moss *et al.*, 2001). También el nivel de fragmentación del almidón influye en la digestibilidad del ensilado así como el tamaño de partícula del almidón y la concentración de lignina (Ferreira y Mertens, 2005).

Los sucesos bioquímicos y microbiológicos que ocurren durante el ensilado pueden dividirse en cuatro etapas:

(1) Los procesos aerobios, durante el llenado e inmediatamente después del sellado mientras exista aire entre las partículas de la planta y el pH sea de 6.0 – 6.5. (2) En esta etapa continúa la respiración así como la proteólisis y la actividad de microorganismos aeróbicos (enterobacterias, hongos y levaduras). (3) La fermentación, que es efectuada por una sucesión dinámica de bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales cambian de acuerdo a las condiciones que prevalecen en el ensilado (*Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*). (4) Los ácidos orgánicos (principalmente láctico) se acumulan y el pH disminuye por debajo de 5.0, dependiendo de la composición de la planta y la capacidad reguladora del sistema. Durante el período del ensilaje, el silo es sellado, penetra poco oxígeno y solo ocurren cambios insignificantes. En la etapa de descarga para la alimentación, el ensilado es reexposto al aire, hay una reactivación de los

microorganismos aeróbicos, principalmente levaduras y mohos, que pueden descomponer el ensilado (Weinberg y Ashbell, 2003).

La preservación del ensilado depende de la generación de la acidez que inhibe la actividad de microorganismos indeseables bajo condiciones anaerobias. Así, las BAL nativas que están presentes en los cultivos forrajeros, convierten los azúcares en ácido láctico durante el proceso de ensilado disminuye el pH, sin embargo, cuando el silo esta abierto las condiciones aerobias prevalecen al tiempo de su suministro; el ensilado está sujeto al crecimiento de microorganismos aerobios potencialmente inestables (Cai *et al.*, 1999).

Durante el ensilaje ocurre una proteólisis completa, cuyos productos principales son aminoácidos libres, que posteriormente son catabolizados a aminas, amoniaco y ácidos carboxílicos; esta degradación influye en el valor nutritivo del ensilado (Winters *et al.*, 2002).

Del mismo modo, las características de fermentación en el ensilado (pH, ácido láctico y acético), materia seca (MS) y las pérdidas de MS son afectadas por procesos mecánicos, el estado de madurez del cultivo, y la inoculación de bacterias ácido lácticas, no obstante, es necesaria más investigación para entender la interacción del proceso mecánico, madurez e inoculación (Jonhson *et al.*, 1999).

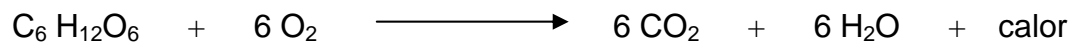
Los ensilados bien preservados son más propensos al deterioro aerobio, que los ensilados pobremente fermentados. El daño se incrementa con la pérdida de materia seca ya que se reduce el valor nutricional del ensilado (Cai *et al.*, 1999). Por otra parte el incremento del contenido de materia seca disminuye la proteólisis, al igual que los aditivos biológicos o químicos; por el contrario el picado la incrementa, la fermentación es más rápida en el material picado (Slottner y Bertilsson, 2006).

Proceso de Fermentación

El proceso deseado que tiene lugar en el silo, puede ser descrito en una secuencia de cuatro fases:

Fase 1. Respiración

Una vez que la planta es cortada y las células pierden su estructura, continúan consumiendo oxígeno de acuerdo a la siguiente ecuación:



Esta ecuación indica que la respiración convierte el azúcar en dióxido de carbono, agua y calor. Por lo tanto, la respiración resulta en una pérdida de materia seca y energía disponible. Sumado a ello, el calor liberado por la respiración aumenta la temperatura del forraje.

Temperaturas entre 26°C – 32 °C pueden causar pérdidas significativas de nutrientes. Se ha demostrado que el aumento de temperatura es menor en silos pobremente empacados. La rápida expulsión de oxígeno es deseable porque disminuye tanto la extensión de la fase de respiración como las pérdidas asociadas de nutrientes. Normalmente la respiración continúa por uno o dos días mientras haya oxígeno en el ensilaje. Por lo tanto compactar el ensilaje para expulsar el aire lo más rápidamente posible, restringirá las pérdidas por respiración (Pitt, 1983).

Fase 2. Fermentación enterobacteriana

La fermentación temprana que produce ácido acético, fórmico y otros ácidos orgánicos como resultado del crecimiento de enterobacterias, las cuales pueden vivir en presencia o en ausencia de oxígeno (1 – 2 días).

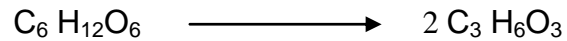
El destino del ensilaje realmente depende en gran parte del resultado de esta fase de fermentación. Se han reportado de 10^7 a 10^{10} microorganismos por gramo de forraje fresco cosechado, y parte de ellos son indeseables para el proceso de conservación del ensilaje. Muchos de estos microorganismos requieren oxígeno para crecer (bacterias aerobias estrictas), por lo tanto, a disminución de oxígeno en el ensilaje compactado, resulta ser una selección natural y por ende una disminución en el número de bacterias que necesitan oxígeno para su crecimiento (Ashbell *et al.*, 2001).

A medida que el oxígeno es removido y empieza la fermentación, las bacterias que se vuelven predominantes son aquellas con la habilidad de vivir tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (bacterias aerobias facultativas). Este grupo incluye a las bacterias que convierten azúcares en una variedad de ácidos orgánicos, dióxido de carbono e hidrógeno (Bolsen *et al.*, 1983).

A medida que la fermentación prosigue, las enterobacterias se vuelven menos competitivas por ser particularmente sensibles a la disminución de pH. El crecimiento de estas bacterias es inhibida cuando el pH cae por debajo de 4.5, lo cual usualmente ocurre a los pocos días del ensilaje. Sin embargo, las enterobacterias tienden a persistir por largos períodos (Leinbensperger y Pitt 1987).

Fase 3. Fermentación de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas comienzan a dominar el proceso de fermentación, después de que el pH desciende a 5.5 – 5.7. Unas pocas especies de bacterias ácido lácticas pueden vivir en presencia de oxígeno, pero la mayoría son estrictamente anaerobias implicando que el oxígeno es tóxico para ellas. La reacción que describe la fermentación láctica es simple, una molécula de azúcar es fraccionada en dos moléculas de ácido láctico



Algunas especies de BAL producen solo ácido láctico conocidas como homofermentativas, en donde se puede apreciar en la figura 1, que la degradación fermentativa de la glucosa, da como producto final ácido láctico; en la figura 2 se muestra otra ruta metabólica en donde otras especies de bacterias ácido lácticas que tienen la capacidad de producir ácido láctico y otros productos terminales como ácido acético, etanol y dióxido de carbono, denominadas heterofermentativas. Las especies homofermentativas son preferibles en el ensilaje por que producen ácido láctico que es más fuerte y disminuye más rápido el pH que el ácido acético. Actualmente, mientras el pH desciende, el ácido láctico se vuelve un producto terminal predominante en la fermentación. La correcta producción de ácido láctico depende de los siguientes tres factores: El número de bacterias ácido lácticas presentes en el ensilaje. La presencia en cantidad suficiente de azúcares fermentables. La ausencia de oxígeno en el ensilaje. El número de BAL presentes al momento del ensilaje pueden variar de 1×10^3 a 20×10^6 por gramo de forraje fresco y no pueden ser controladas fácilmente (Satter *et al.*, 1988).

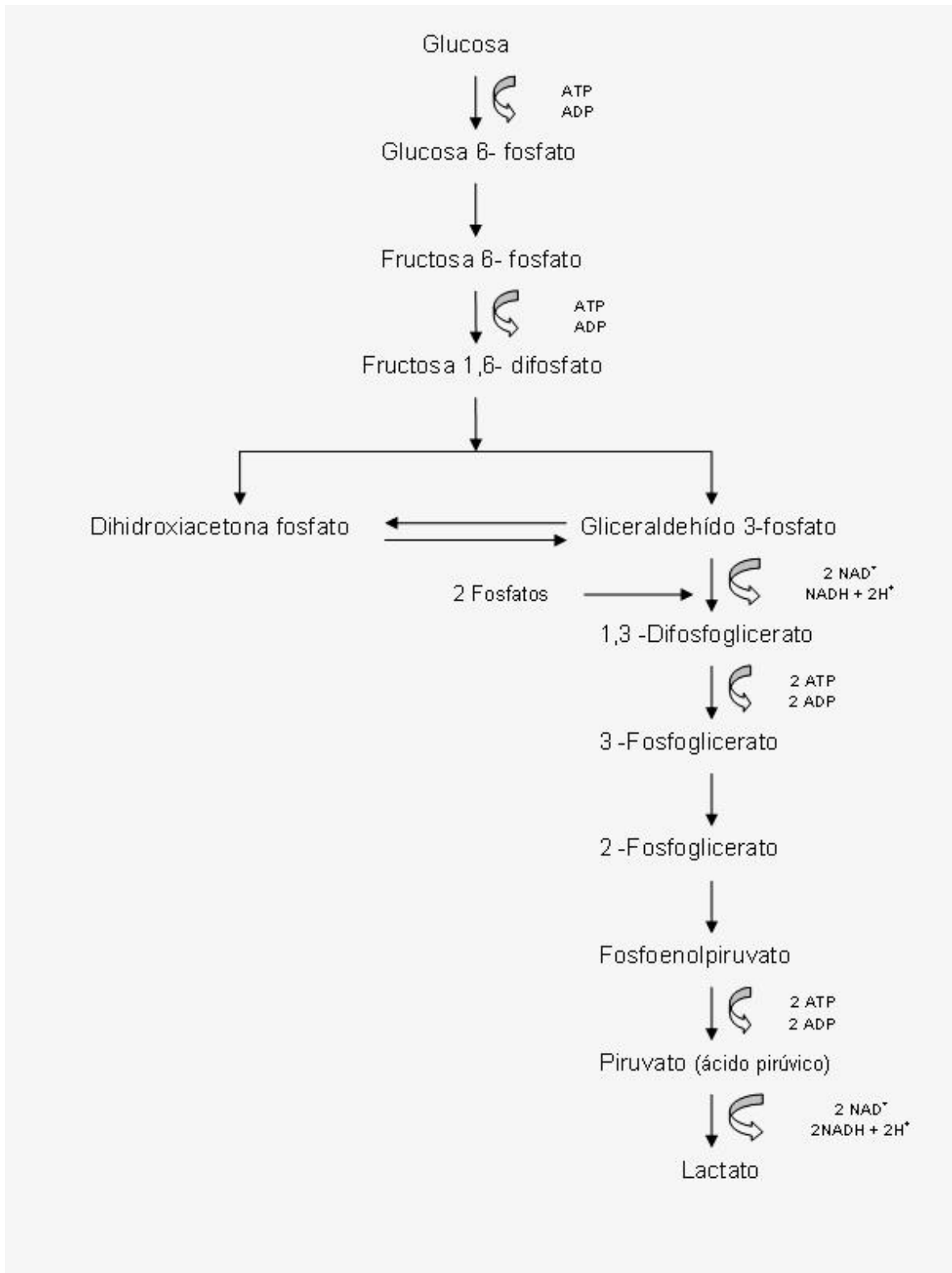


Figura 1. Ruta de fermentación homoláctica.

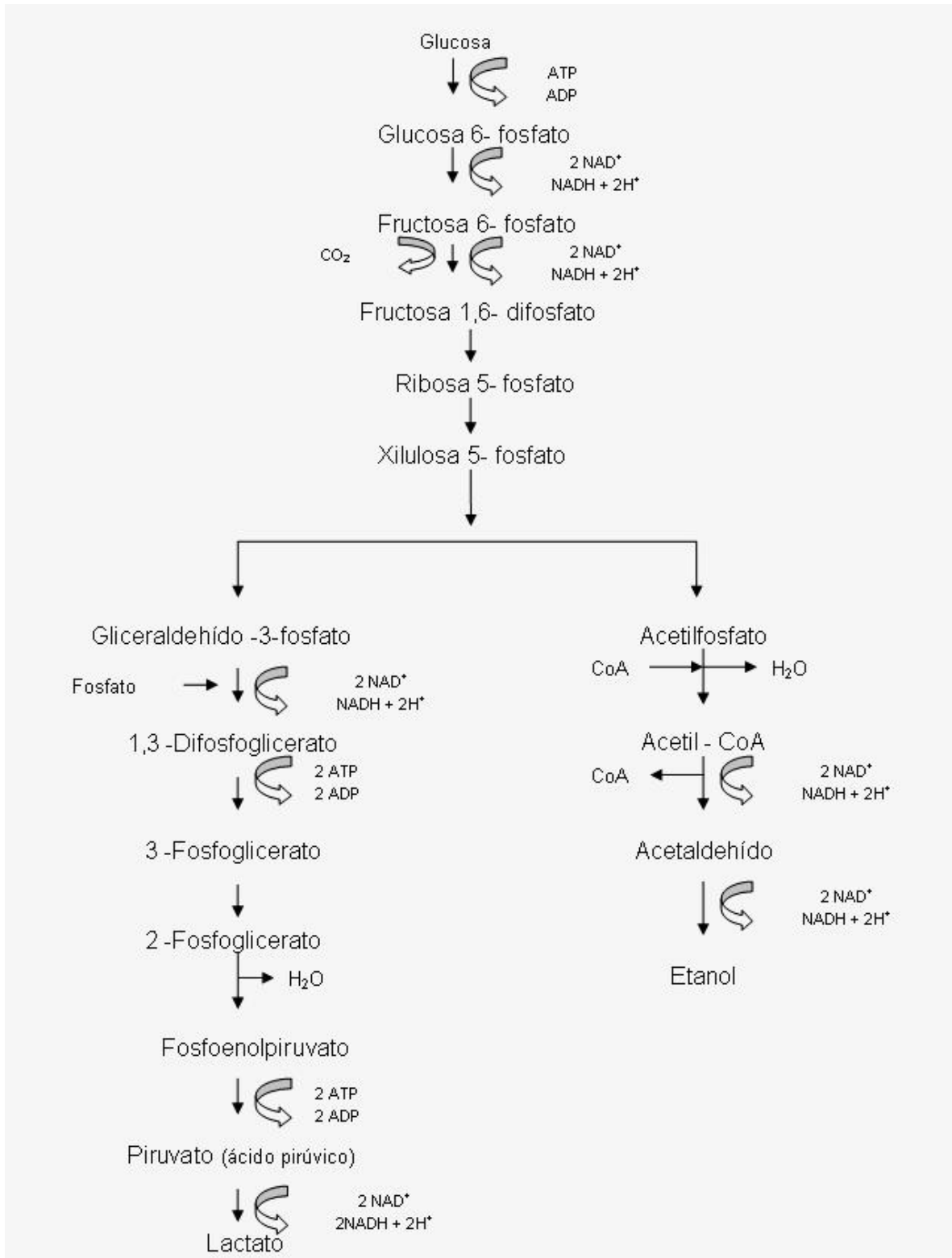


Figura 2. Ruta de fermentación heteroláctica.

Fase 4. Estabilización del Ensilaje

Luego de 14 días de fermentación, un ensilaje de gramíneas bien conservado contiene 1.5 a 2 % de ácido láctico y con un rango de pH de 3.5 – 4.2. La fuerte acidez creada durante la fermentación láctica desencadena a una serie de “semi-esterilización” de la masa de ensilaje en el sentido de que todo crecimiento bacteriano es paralizado, y eventualmente el crecimiento de las bacterias ácido lácticas se inhiben a sí mismas. Esta fase estable puede durar meses (y hasta años) mientras el silo se mantenga cerrado y protegido de la penetración del oxígeno. Por lo tanto, es importante cubrir el silo con un buen plástico, que sea bien cerrado y tenga un buen nivel de permeabilidad de aire. Altas pérdidas de materia seca pueden ocurrir debido a un pobre trabajo de cobertura (Harrison *et al.*, 1991).

Algunas especies de clostridios fermentan aminoácidos con la formación de sustancias tóxicas como cadaverina y putrescina. Un ensilaje estropeado por clostridios es fácilmente reconocido debido a su fuerte olor, pH por encima de 5.0, nitrógeno amoniacal y mayor concentración de ácido butírico que láctico (Oelberg *et al.*, 1983).

El deterioro aeróbico del ensilado, ocurre cuando el oxígeno puede penetrar a la masa compactada. Las pérdidas causadas por no proteger al silo del oxígeno en el momento del ensilado son debidas a la continua respiración y a la fermentación indeseable bacteriana. Sin embargo el deterioro aeróbico puede también resultar del desarrollo de otros microorganismos incluyendo hongos y levaduras. Los hongos y las levaduras resisten pH tan bajos como 2.0, pero se mantienen en latencia en el ensilaje estable alrededor de 4.0 – 4.5. Los hongos requieren de azúcares y oxígeno para desarrollarse y pueden reanudar su desarrollo rápidamente una vez que el oxígeno esta presente, pero las levaduras pueden crecer con y sin oxígeno y pueden producir algún alcohol en ensilajes ricos en azúcares como el maíz. Mas de 60 especies de hongos han sido aisladas de ensilajes, pero el riesgo del deterioro aeróbico depende del tipo de forraje

ensilado. Paradójicamente, el riesgo de desarrollo de estos microorganismos indeseable aumenta la calidad de conservación del ensilaje. Los azúcares residuales en un silo bien conservado es la fuente de energía ideal para hongos y levaduras. Sumado a ello, un silo bien conservado tiene poco o nada de ácido butírico que es un fuerte inhibidor del crecimiento de hongos y levaduras. Por lo tanto luego de abrir un silo bien conservado tiene una gran oportunidad de deterioro, debido a hongos y levaduras que un silo pobremente conservado (Oelberg *et al.*, 1983)

1.1.2 Factores que afectan el ensilado

La calidad del ensilado es determinada por las condiciones anaerobias del sistema (Ranjit y Kung, 2002; Snell *et al.*, 2002). Se describen a continuación los siguientes factores:

1. Etapa de madurez del cultivo.

La etapa de madurez del cultivo al cosecharlo es el principal factor en la determinación del valor nutritivo del ensilado; sin embargo es difícil evaluar esto por los resultados tan variados que se observan entre las diferentes etapas de madurez (Jonhson *et al.*, 1999). Asimismo, el manejo de los métodos de cosecha influye en el valor nutricional del ensilado, particularmente la altura del corte, que es directamente proporcional a éste, siendo recomendables alturas entre 13 y 45 cm. (Neylon y Kung, 2003).

2. Contenido de humedad.

Del mismo modo el contenido de humedad del cultivo ensilado afecta la cantidad de bacterias, la velocidad de fermentación y la pérdida de energía, debido a la respiración prolongada de la planta y a la fermentación por microorganismos, así, la marchites previa de la planta puede reducir estas pérdidas y mejora la digestibilidad (Yahaja *et al.*, 2002). En estudios *in Vitro* se observó que un

ensilado fresco alcanza más rápidamente su velocidad máxima de fermentación que un ensilado seco, debido a la colonización más rápida de los microorganismos del rumen, aunque la velocidad máxima de fermentación del ensilado seco es mayor (Calabro *et al.*, 2005).

3. Tamaño de corte y grado de maceración de la planta.

Otros estudios han reportado que el tamaño del corte y grado de maceración de la planta, pueden influir en las características de fermentación del ensilado, un corte pequeño o demasiada maceración incrementa la proliferación de bacterias ácido lácticas, altera el contenido de Materia seca y la pérdida de la misma y reduce el pH final (Jonhson *et al.*, 1999; Jonhson *et al.*, 2002).

4. Contenido de Oxígeno.

En el ensilado la falta de oxígeno y la acumulación de ácido láctico resulta en un bajo pH que inhibe el metabolismo microbiano y preserva los nutrientes, pero cuando se exponen al aire, ciertos microorganismos se vuelven metabolitamente activos y producen calor, consumiendo los nutrientes del ensilado provocando la pudrición. El lactato es asimilado por levaduras tales como *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Pichia*, que son la causa principal del deterioro aerobio y en menor grado la pudrición puede ser causada por mohos, bacilos, bacterias ácido acéticas y ácido lácticas (Ranjit y Kung, 2000).

5. Temperatura

El deterioro del ensilado, también ésta influido por la composición de la población de microorganismos, el tipo de sustrato y la temperatura, usualmente el lactato es la causa principal de la deterioración aerobia. Algunos lactatos asimilables por las levaduras se generan en medios en los que el pH se encuentra entre 3 – 8 y la temperatura por debajo de los 40 °C (Jonhson *et al.*, 2001).

Cuando los ensilados son expuestos por primera vez al aire, el ácido láctico y otros azúcares reductores son desdoblados y asimilados por las levaduras, incrementando la temperatura y cuando la temperatura es mayor de 45°C, la cantidad de levaduras presentes declina y proliferan otros microorganismos. Los niveles de pH tienden a incrementar el amonio y disminuir la concentración de aminas acumulables y ácidos orgánicos (Jonhson *et al.*, 2001).

También se ha observado que la temperatura es un parámetro que influye en el tiempo de incubación para obtener un buen ensilado, de tal manera que cuando la temperatura es mayor, el tiempo de incubación disminuye (Yang *et al.*, 2001).

1.1.3 Aditivos y suplementos utilizados en los ensilados

Los aditivos para ensilar pueden servir para varios propósitos, se clasifican de acuerdo a sus funciones en estimulantes e inhibidores de la fermentación, inhibidores de la deterioración aeróbica y de los nutrientes y absorbentes, además pueden ser biológicos o químicos; existe una gran lista de aditivos disponibles, los cuales vienen en una variedad de formas: líquidos, sólidos o suspensión y pueden aplicarse durante el proceso de picado o en el llenado de los silos (Weinberg y Ashbell, 2003; Slottner y Bertilsson, 2006).

Algunas investigaciones han reportado efectos positivos en la fermentación del ensilado, cuando se usan algunas bacterias ácido lácticas como aditivos inoculantes, relativamente pocas han reportado el deterioro del ensilado. *Lactobacillus casei* y *L. plantarum* son usualmente encontradas viviendo en asociación con cultivos forrajeros ensilados. Los lactobacilos son la población microbiana dominante en los cultivos forrajeros y promueven efectivamente la fermentación ácido láctica, caso contrario al de los cocos (por ejemplo: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela* y *Pediococcus*) que retardan la producción del ácido láctico (Cai *et al.*, 1999).

La adición de bacterias ácido lácticas al ensilado como inoculantes, está destinada a asegurar una rápida y vigorosa fermentación que resulta en una pronta acumulación de ácido láctico y valores bajos de pH a etapas más tempranas del ensilado, con lo cual se mejora la conservación del forraje (Cai *et al.*, 1999; Jonhson *et al.*, 2002). Por ejemplo, *Lactobacillus buchneri* solo o en combinación con *L. plantarum* es un efectivo agente protector de los ensilados de trigo, sorgo y maíz contra el ataque de levaduras y mohos del aire, bajo condiciones de laboratorio, especialmente en climas cálidos (Adesogan *et al.*, 2003; Filya, 2003 a, b; Holzter *et al.*, 2003).

Además se ha demostrado que el ensilado tratado con *L. buchneri* tiene más de un 30% de estabilidad al aire que cuando no es tratado, e incrementa la producción de leche (Kung *et al.*, 2001). Por otra parte, la adición de enzimas mesófilas y termófilas (principalmente xilanasas y endoglucanasas) provenientes de hongos (*Trichoderma reesei*, *Thermoascus aurantiacus*) han mostrado favorecer la acidificación del ensilado, incrementando con ello la disponibilidad de sustratos fermentables para los microorganismos del ensilado, obviamente la actividad de éstos preparados depende del tipo de enzima presente que está relacionada al pH y a la temperatura óptima, no obstante estas enzimas son más estables a temperaturas bajas y pH ácido (Colombatto *et al.*, 2004).

La selección de los aditivos para ensilar y de los cultivos híbridos, repercute en los tiempos de madurez de la fermentación del ensilado y en el rendimiento animal (Jonhson *et al.*, 1999).

También el reciclado de productos lácteos, tiene un potencial en el ensilado para alimentación animal, ya que estos productos tienen alto valor nutricional para los rumiantes, pero deben ser estabilizados antes de su uso, por ello son mezclados con plantas, además estos productos son desechados causando contaminación ambiental (Weinberg *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2003).

1.1.3.1 Características del lactosuero utilizado como aditivo

El lactosuero es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración de queso. Se obtiene tras la separación de las proteínas, llamadas caseínas, y de la grasa (Spreer, 1991). Ese líquido contiene la mayor parte de los compuestos de la leche que son solubles en agua. La composición química del suero varía dependiendo de las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso. Su pH oscila entre 5 – 6 (Cuadro 1).

El agua es el componente más abundante en el suero, constituye el 93% o más de éste. La lactosa está en una proporción cercana al 5%. Un poco menos del 1% lo constituyen compuestos nitrogenados, de los cuales la mitad son proteínas, de alto valor nutritivo, que se clasifican en albúminas, globulinas y una fracción denominada proteosa – peptona. Otros compuestos del suero son los minerales que se encuentran en concentraciones de alrededor de 0.7%, encontrándose en mayor cantidad el sodio, el potasio, el magnesio, el cloruro y el fosfato. El suero contiene además las vitaminas hidrosolubles de la leche, de las cuales la más importante es la riboflavina o vitamina B, y en cantidades muy variables hay grasa y ácido láctico (Spreer, 1991).

Cuadro 1. Composición del lactosuero.

Parámetro	Suero dulce	Suero ácido
Agua	93 – 95%	93 – 95%
Extracto Seco	5 – 7%	5 – 7%
Lactosa	4.5 – 5.3 %	3.8 – 5.2 %
Proteínas	0.6 – 1.1 %	0.2 – 1.1 %
Grasa	0.1 – 0.4 %	0.1 – 0.5 %
Sales minerales	0.5 – 0.7 %	0.5 – 1.2%
Ácido láctico	0.1 – 0.2%	0.2 – 1.2%
Cloruros	0.15 – 0.6 %	0.16 – 0.6 %
Finos	0.05 – 0.3%	0.05- 0.3 %
Valor de pH	6.45	5

(Spreer, 1991)

El lactosuero es un excelente medio de cultivo, cuya principal fuente de carbono es la lactosa, sin embargo, su uso no se limita a fermentaciones en las que se usen microorganismos capaces de metabolizar este azúcar. La lactosa se puede transformar en glucosa y galactosa, o mediante una primera fermentación, transformarla en ácido láctico, y en una segunda fermentación, utilizar el metabolito como fuente de carbono. Entre los productos que pueden ser obtenidos mediante la fermentación del lactosuero, se encuentran: bacterias lácticas y otros microorganismos usados en las propias queserías, ácido láctico, alcohol, ácido acético, ácido propiónico, enzimas (proteasas y pectinasas), penicilina, vitamina B₂ y B₁₂, aceite y proteína unicelular para alimento humano y de animales (Hayaski, 1990).

No todos los lactosueros son iguales. Una de las diferencias principales entre ellos es su composición, que depende no solamente de la composición de la leche para quesería y del contenido de humedad del queso, sino, de manera muy significativa, del pH al que el lactosuero se separa de la cuajada (Spreer, 1991).

1.1.3.2 Bacterias ácido lácticas usadas como aditivos en el ensilaje

Las bacterias ácido lácticas (BAL), forman un grupo de bacterias Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativas, estos microorganismos no contienen citocromo oxidasa, son anaerobios o microaerofilos, ácido tolerantes y estrictamente fermentativos; el ácido láctico es el principal producto final de la fermentación de los azúcares (Axelsson, 1998).

La fermentación de los azúcares por las BAL, en condiciones normales de su metabolismo, pueden utilizar dos vías de fermentación. La glucólisis es una de estas rutas, donde se produce ácido láctico como producto final de la fermentación (figura 1). La ruta 6-glucosa fosfato o fosfoctolasa, tiene como productos finales de fermentación: etanol, acetato, CO₂ y ácido láctico, comúnmente llamada fermentación heteroláctica (figura 2). Las condiciones de crecimiento de algunas

BAL pueden alterar significativamente la formación del producto final (Axelsson, 1988).

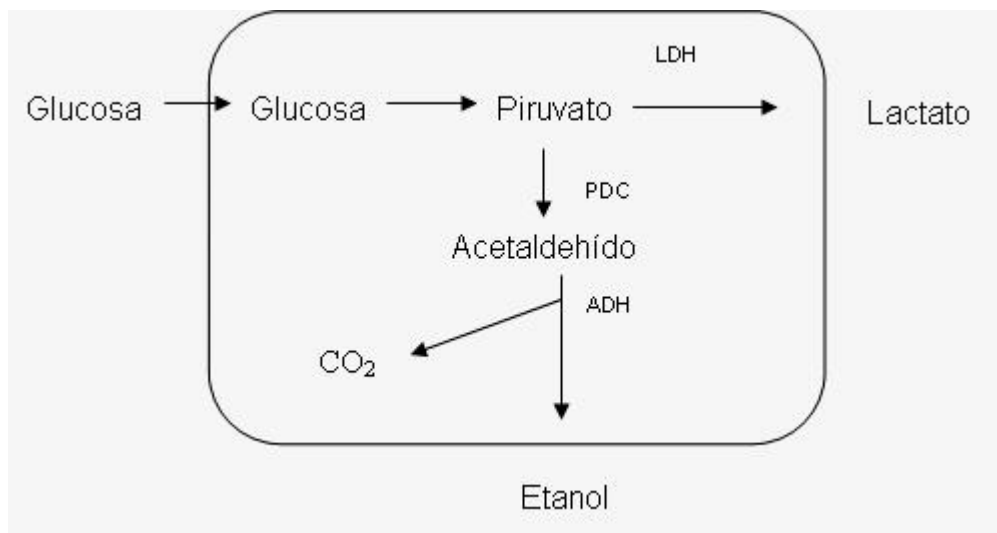
La historia del uso de las BAL en los alimentos es larga y muchas de las cepas son consideradas como microorganismos comensales con potencial no patogénico. Su presencia natural en el epitelio intestinal y en el tracto gastrointestinal y el uso tradicional en alimentos fermentados y en productos lácteos sin problemas significativos en la seguridad de consumo. Los miembros del género *Lactobacillus* son los que comúnmente brindan la seguridad o están generalmente reconocidos como seguros (GRAS), los miembros del género *Streptococcus* y *Enterococcus* son patógenos oportunistas.

Las bacterias ácido lácticas producen una gran cantidad de sustancias antimicrobianas, incluyendo: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Worobo *et al.*, 2000).

El mecanismo preciso por el que las bacterias ácido lácticas causan inhibición de microorganismos similares es bastante complejo y no ha sido comprendido totalmente. La actividad inhibitoria de las BAL puede ser atribuido a la creación de un ambiente hostil para la reproducción de patógenos y mantenimiento de esporas en alimentos, el mecanismo propuesto para tales efectos incluyen la producción de ácido láctico y de otros ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, competición por la disponibilidad de nutrientes, alteración del potencial de oxido – reducción y la producción de bacteriocinas o antibióticos (Kurmann, 1978). Generalmente el efecto de la actividad inhibitoria esta compuesta de diversos factores. Se conoce que existe la acumulación de peróxido de hidrógeno en cultivos de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, y *Pediococcus*. Anders *et al.* (1970), observo que *Lactococcus* producía suficiente peróxido de hidrógeno para ser auto – inhibitorio. La acumulación de peróxido de hidrógeno en el crecimiento del medio ocurre porque el lactobacilo no posee la enzima catalasa (Kandler y Weiss 1986).

1.1.3.2.1 *Lactobacillus rhamnosus*

Es un bacteria ácido láctica, con forma bacilar, Gram positiva, no esporulada, catalasa negativa, anaerobia facultativa, que produce 98 % de L (+) ácido láctico como producto final de la fermentación de los azúcares y el 2% de etanol, bajo condiciones anaerobias (figura 3). Es el único lactobacilo que puede fermentar rhamnosa, perteneciente al grupo de los heterofermentativos facultativos del género *Lactobacillus* (Narayanan *et al.*, 2004).



1. LDH Lactato deshidrogenasa
2. PDC Piruvato descarboxilasa
3. ADH Alcohol deshidrogenasa

Figura 3. Ruta de fermentación de la glucosa de *L. rhamnosus*.

(Narayanan *et al.*, 2004).

1.2 El sorgo forrajero

El sorgo pertenece a la familia de las gramíneas, nativa de África y Asia, donde se cultiva desde la antigüedad. El sorgo forma parte de la dieta básica de millones de personas en China, la India y África; en los países industrializados se cultiva sobre todo como planta forrajera. El sorgo tiene una altura de 1 a 2 metros. Tiene inflorescencias en panojas y semillas de 3 mm, esféricas y oblongas, de color negro, rojizo y amarillento. Tiene un sistema radicular que puede llegar en terrenos permeables a 2 m de profundidad. El sorgo se utiliza para producir grano que sirve para la alimentación del ganado, y también para el forraje (Owen y Moline, 1970).

El sorgo es uno de los cereales más resistentes a la sequía; en condiciones de sequedad y calor extremas, la planta entra en una fase de descanso y cuando la situación mejora recupera la actividad. El sorgo azucarado contiene en el tallo un jugo dulce, y se cultiva para obtener jarabes y como planta forrajera. Los llamados sorgos de hierba, como el sorgo sudanés y los híbridos de éste con el sorgo azucarado y con el de grano, se cultivan como plantas de forraje y pasto (Ibar, 1984).

Entre los usos de las especies de sorgo forrajero se han incluido los ensilados, forraje verde, pastura, forraje y como heno para ganado. Owen y Moline (1970) propusieron una clasificación general para los sorgos forrajeros basado en su uso:

- 1) Columbus grass (*Sorghum almum*) usado para pastura.
- 2) Johnsongrass (*Sorghum halapense*), sudangrass (pasto de Sudán) o híbridos de sudangrass, usado para pastura, forraje verde o heno.
- 3) Híbridos de sorgo y pasto de Sudán usado para forraje verde o heno.
- 4) Ensilados usando sorgos y cañas.
- 5) Doble propósito (por ejemplo producción de grano y forraje).

Los sorgos forrajeros crecen en las grandes planicies en donde existe insuficiente humedad para la producción de maíz. La mayoría de los sorgos forrajeros crecen en los trópicos semiáridos o subtropicos que han sido clasificados como doble propósito, con el grano usado para alimentación humana y horneado.

Las comparaciones entre los tipos de sorgo en lo que se refiere a la composición nutricional y cantidad de nutrientes han sido reportadas por diversos autores. Burns y Kimbrough (1981) no encontraron diferencias en la digestibilidad *in Vitro* de materia seca (IVDMD) entre sorgos forrajeros, granos de sorgo, híbridos de sorgo y pasto de Sudán y el mijo. Por otra parte, se han reportado estudios en donde se han encontrado diferencias. Ritchie *et al* (1972) reportaron una ventaja de 0.14 Kg en promedio diario en el ensilado de grano de sorgo para la alimentación ganado vacuno en comparación con el forraje de sorgo. Ward y Smith (1968) encontraron que la mayor diferencia entre forraje estéril de sorgo y la mejor producción de grano híbrido fue en el alto consumo final del ensilado. Bolsen *et al* (1983) también encontraron que el ensilado de granos de sorgo forrajero resulto en mejores granos para la alimentación de ganado vacuno aumentando la eficiencia de la materia seca comparada con forraje estéril de sorgo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Viabilidad de BAL en forraje fresco

Cai *et al* (1999) seleccionaron dos cepas, *Lactobacillus casei* FG 1 y *Lactobacillus plantarum* FG 10 usadas como aditivos en alfalfa, pasto italiano y sorgo, se estudió el efecto en las características de fermentación y el deterioro aerobio de ensilados, en el conteo de viabilidad encontraron 1.0×10^3 UFC de *L. casei* FG 1 y *L. plantarum* FG 10.

Kung *et al* (2001) determinaron el efecto de la aplicación seca o líquida de *Lactobacillus plantarum* MTD 1 en la fermentación de ensilado de alfalfa, encontrando $5.04 - 5.41 \times 10^{10}$ UFC de *L. plantarum* MTD 1.

Taylor *et al* (2002), determinaron el efecto del tratamiento del cultivo de cebada con *L. buchneri* 40788 en la fermentación del ensilado, estabilidad aerobia y valor nutritivo de las vacas lecheras, reportando una viabilidad de 4.0×10^5 UFC de *L. buchneri* 40788. Filya (2003b) determinó el efecto de *Lactobacillus buchneri*, solo o en combinación con *Lactobacillus plantarum*, en la fermentación, estabilidad aeróbica, y degradabilidad ruminal de materia seca de ensilados de maíz y sorgo, bajo condiciones de laboratorio. Después de 90 días de fermentación, contabilizaron 6.24×10^{10} 9.18×10^{10} UFC de *L. buchneri*, *L. plantarum* respectivamente. Ranjit y Kung (2000) evaluaron el efecto de *L. buchneri*, *L. plantarum* en la preservación química en la fermentación y la estabilidad aerobia del ensilado de maíz, encontraron que el ensilado inoculado con *L. buchneri*, contenía 6.3×10^9 UFC viables y el ensilado inoculado con *L. plantarum* 2.4×10^{11} UFC viables.

Adesogan *et al.*, (2002) determinaron el efecto de inoculantes de *Lactobacillus buchneri*, *L. fermentum* y *Leuconostoc mesenteroides* en la fermentación, estabilidad aerobia y valor nutritivo de granos empaquetados de trigo, realizaron un conteo de 7.0×10^{10} de *L. fermentum*, 1.0×10^{10} de *Leuconostoc mesenteroides*, y 4.0×10^9 de *L. buchneri*.

Cuadro 2. Viabilidad de BAL en forraje fresco.

Autor	Tipo de Bacteria Ácido Láctica	UFC /g forraje fresco
Danner <i>et al</i> (2002)	<i>Lactobacillus s.s</i>	7.0×10^8
Cai <i>et al</i> (1999)	<i>L. casei</i> FG 1 y <i>L. plantarum</i> FG 10	
Kung <i>et al</i> (2001)	<i>L. plantarum</i> MTD 1	$5.04 - 5.41 \times 10^{10}$
Taylor <i>et al</i> (2001)	<i>L. buchneri</i> 40788	4.0×10^5
Filya (2003b)	<i>L. buchneri</i> , <i>L. plantarum</i>	6.24×10^{10} ; 9.18×10^{10}
Ranjit y Kung (1999)	<i>L. buchneri</i>	6.3×10^9
	<i>L. plantarum</i>	2.4×10^{11}
Adesogan <i>et al</i> (2002)	<i>L. fermentum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. buchneri</i>	7.0×10^{10} ; 1.0×10^{10} ; 4.0×10^9

2.2 Ácidos orgánicos y pH en ensilados con BAL

En el cuadro 3, se muestran los resultados encontrados por diversos autores. Danner *et al* (2003) reporta que el ensilado de cultivo de maíz tuvo un pH de aproximadamente 3.8, los ensilados inoculados con bacterias homofermentativas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. plantarum*) tenían valores de pH alrededor de 3.8 y concentraciones de ácido láctico entre 31.9 y 35.4 g/ Kg de materia seca. En los mismos ensilados la concentración de ácido acético fueron significativamente bajas que en la concentración del control (que no fue inoculado), el promedio de la estabilidad aeróbica fue de 26 a 31 horas, el cual fue mas bajo que la estabilidad aeróbica en el control (40 h).

En contraste, la inoculación con bacterias ácido lácticas heterofermentativas (*L. buchneri*, *Lactobacillus brevis*) le dan a los ensilados mucho más estabilidad contra el deterioro aerobio. Se observaron altas concentraciones de ácido acético, especialmente en ensilados inoculados con *L. buchneri* (55.3 g /Kg de materia seca) y con *L. brevis* (28.6 g /Kg materia seca). El pH final de los ensilados inoculados con *L. buchneri* fue de 4.11. Todos los ensilados de alfalfa, pasto italiano y sorgo, tratados con bacterias ácido lácticas fueron bien preservados, el valor de pH y los contenidos de ácido acético y amonio N fueron bajos ($P < 0.05$), y los contenidos de ácido láctico y carbohidratos hidrosolubles fueron más altos ($P < 0.05$), que el ensilado control. Los contenidos de ácido butírico y ácido propionico en los tres ensilados control fue de 7.3 a 11.8 y 3.6 a 8.3 g /Kg de materia seca, respectivamente, pero estos ácidos en los ensilados tratados con BAL en alfalfa y pasto italiano fueron de 4.5 a 8.5 y de 1.5 a 3.6 g /Kg de materia seca, y el ensilado de sorgo tratado con BAL, estos ácidos fueron iguales o menores al nivel detectable (0.01g/Kg de materia seca). Comparado con cada ensilado control. Los tratamientos con BAL reducen la pérdida de materia seca y la producción de gas ($P < 0.05$), y efectivamente provee al ensilado con calidad.

Cai, *et al* (1999), a los 40 días de fermentación, todos los ensilados de alfalfa, pasto italiano y sorgo, tratados con bacterias ácido lácticas fueron bien preservados, el valor de pH de 3.5 y los contenidos de ácido acético y amonio N fueron bajos ($P < 0.05$), y los contenidos de ácido láctico (18.5 – 55.5 g /Kg de materia seca) y carbohidratos hidrosolubles (cuadro 5) fueron más altos ($P < 0.05$), que el ensilado control. Los contenidos de ácido butírico y ácido propionico en los tres ensilados control fue de 7.3 a 11.8 y 3.6 a 8.3 g /Kg de materia seca, respectivamente, pero estos ácidos en los ensilados tratados con BAL de alfalfa y pasto italiano fueron de 4.5 a 8.5 y de 1.5 a 3.6 g /Kg de materia seca, y el ensilado de sorgo tratado con BAL, estos ácidos fueron iguales o menores al nivel detectable (0.01g/Kg de materia seca).

Comparado con cada ensilado control. Los tratamientos con BAL reducen la pérdida de materia seca y la producción de gas ($P < 0.05$), y efectivamente provee al ensilado con calidad.

Cuadro 3 Metabolitos derivados de la fermentación y pH en ensilados con BAL.

Autor	pH	Ácidos Orgánicos (g Kg/ materia seca)				Amonio – N (g Kg/ materia seca) NA
		Láctico	Acético	Butírico	Propiónico	
Danner <i>et al</i> (2002)	3.8 – 4.11	31.9	28.6			
		-	-			
		35.4	55.3	ND	NA	
Cai <i>et al</i> (1999)	3.5	18.5	8.8	4.5	1.5	0.8
		-	-	-	-	-
		55.5	12.8	8.5	3.6	1.6
Kung <i>et al</i> (2001)	4.66	56.6	56.7	0.2	1.1	2.1
		-				
		57.9				
Taylor <i>et al</i> (2001)	4.37	47.0	59.2	NA	NA	3.2
Filya (2003b)	3.80	2.54	0.33	NA	NA	0.211 – 0.308
		-	-			
		9.39	4.30			
Ranjit y Kung (1999)	3.67; 3.72; 3.70	72.7; 66.2; 72.2	20.4; 45.4; 21.8	NA	NA	1.29; 1.31; 1.35
Adesogan <i>et al</i> (2002)	3.7	131.7	NA	NA	NA	4.3

ND No detectado

NA No analizado

2.3 Carbohidratos hidrosolubles en ensilados con BAL.

Kung *et al* (2001), después del día 2 de ensilaje, en ensilados tratados con un contenido del 30% de material seca, en ambas formas de inoculación tuvieron mas ($P<0.05$) del doble de concentración de ácido láctico (56.6 a 57.9 g / Kg de materia seca) y un pH de 4.66 que en ensilados sin tratar (25.0 g / Kg de materia seca).

Las cantidades de ácido láctico fueron similares entre los tratamientos en el día 4 y el día 45. Para los ensilados con el 54 % de materia seca, la concentración de ácido láctico en ensilados tratados con el inoculante en forma seca no fue diferente en las concentraciones de ácido láctico en ensilados sin tratar e cualquier tiempo durante la fermentación. En contraste el método líquido de inoculación resulto en ensilado con una alta concentración ($P<0.05$) de ácido láctico que en los ensilados sin tratar después del día 8 y día 14 de ensilaje. Después de 45 días de ensilaje, no hubo diferencias entre los tratamientos en cuanto al contenido de ácido acético sin importar la cantidad de materia seca, pero las concentraciones de ácido láctico fueron más altas en el contenido con 30% de materia seca que en los contenidos con 54% de materia seca.

La concentración de ácido acético fue mucho más baja ($P<0.05$) en los ensilados con el 54% de materia seca (4.0 a 5.9 g / Kg de materia seca) que en los ensilados con el 30% de materia seca (25.4 a 31.0 g / Kg de materia seca), no afecta la forma de inocular después del día 45 de ensilaje. En ensilados con el 30% de contenido de materia seca, ambas formas de inoculación descendieron ($P<0.05$) la producción de ácido acético durante los 8, 14 y 45 días de ensilaje cuando fueron comparadas con ensilados sin tratar.

Los tratamientos no afectaron la concentración de ácido acético en los ensilados con 54% de materia seca. Los ácidos propiónico y butírico fueron menos del 1.0 g / Kg de materia seca en todos los ensilados y no hubieron diferencias entre los tratamientos.

En ambas concentraciones de materia seca, la adición de inoculantes en forma seca o líquida disminuyó ($P < 0.05$) la cantidad de amonio N en relación con los ensilados sin tratar en el día 8 y el día 14 de ensilaje.

En ensilados con el 30% de materia seca, el inoculante seco fue más efectivo ($P < 0.05$) que el inoculante líquido. Al final del ensilaje (día 45), las concentraciones de amonio N en los ensilados con 54 % de material seca (6.6 g / Kg de materia seca a 1.26 g / Kg de materia seca) fueron más ($P < 0.05$) que las mitad de la concentración de amonio N en los ensilados con la más baja concentración de materia seca (2.42 a 2.92 g / Kg de materia seca). La inoculación reduce la concentración de amonio solamente en los ensilados con la mas alta cantidad de materia seca ($P < 0.05$) después del día 45 de ensilaje.

En este estudio, Taylor *et al* (2001) evidenciaron que cuando se aplicó *L. buchneri* 40788 proveyó al ensilado de estabilidad aerobia. El ensilado a nivel laboratorio tuvo las concentraciones más bajas de ácido láctico (47.0 g /Kg de materia seca) pero incrementaron las concentraciones de ácido acético (59.2 g /Kg de materia seca), y el valor de pH fue de 4.37.

Filya (2003b), después de 90 días de ensilaje, los ensilados inoculados con *L. buchneri* tuvieron el pH más alto (3.8) que el control (ensilados inoculados con *L. plantarum* y *L. buchneri* + *L. plantarum* ($P < 0.05$).

Los ensilados inoculados con *L. plantarum* o *L. buchneri* + *L. plantarum* tuvieron el contenido más alto de ácido láctico (2.54 - 9.39 g /Kg de materia seca) que el control y los ensilados inoculados solo con *L. buchneri* (P<0.05). El control y los ensilados inoculados con *L. plantarum* contenían más carbohidratos hidrosolubles residuales (0.64 – 5.96 g /Kg de materia seca) que los ensilados inoculados con *L. buchneri* y *L. buchneri* + *L. plantarum* (P<0.05). Los niveles más altos y tardíos de ácido acético (0.33 - 4.30 g /Kg de materia seca) (P<0.05), concentraciones de amonio N (0.211 – 0.308 g /Kg de materia seca), fueron más bajas en los ensilados inoculados con *L. plantarum* y *L. buchneri* + *L. plantarum* que en los ensilados inoculados con *L. buchneri* (P<0.05). La pérdida de peso fue más alta en los ensilados inoculados con *L. buchneri* que en el control y en los ensilados con *L. plantarum* y *L. buchneri* + *L. plantarum* (P<0.05).

Ranjit y Kung (1999) determinaron que los inoculantes con varias cepas de *L. plantarum* o *L. buchneri* utilizados en ensilados de maíz numéricamente fueron los más bajos en concentraciones de lactato, amonio y etanol, pero ninguna de estas diferencias fueron estadísticamente diferentes. El mecanismo de acción el cual provee estabilidad aerobia determinada por una extensiva fermentación heteroláctica, los valores de pH variaron de 3.67; 3.72; 3.70. Las concentraciones de ácido láctico estuvieron determinados por la utilización de estas dos BAL y su mezcla (72.7; 66.2; 72.2 g /Kg de materia seca), los niveles de ácido acético (20.4;45.4; 21.8 g /Kg de materia seca) y amonio (1.29; 1.31; 1.35 g /Kg de materia seca), respectivamente.

Adesogan *et al* (2003) determinaron que todos los tratamientos inoculados, contenían obligatoriamente bacterias heterofermentativas que usaron la vía 6-fosfogluconato / fosfoquetolasa para fermentar los carbohidratos hidrosolubles en acetato y etanol, todos los aditivos redujeron el pH (3.7), a nivel de en los cuales se detiene el crecimiento de microorganismos indeseables.

Los inoculantes produjeron carbohidratos hidrosolubles residuales de 20 g /Kg de materia seca (cuadro 4) El único ácido que fue analizado fue el ácido láctico con una concentración de 131.7 g /Kg de materia seca y una concentración de amonio N de 4.3 g /Kg de materia seca.

Cuadro 4. Carbohidratos hidrosolubles en ensilados con BAL.

Autor	Carbohidratos hidrosolubles (g Kg/ materia seca)
Cai <i>et al</i> (1999)	11.8 – 38.0
Kung <i>et al</i> (2001)	6.5 – 7.1
Taylor <i>et al</i> (2001)	9.9
Filya (2003b)	0.64 – 5.96
Ranjit y Kung (1999)	6.8
	1.3
Adesogan <i>et al</i> (2002)	20

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas de la industria láctea que se presenta en el Valle de Tulancingo, es que de los 400,000 – 450,000 L/día que se generan de lactosuero ácido por la producción de queso tipo Oaxaca, sólo el 40% del volumen total de este subproducto lácteo es reutilizado, mientras que el resto es vertido al sistema de drenaje y alcantarillado, así como también en el sistema de canales de riego y zanjas sanitarias, sin realizarle ningún proceso de tratamiento, lo que está provocando problemas de contaminación ambiental (Campos *et al.*, 2003).

Con el presente trabajo se pretende evaluar el comportamiento del lactosuero ácido y de BAL como aditivos en el ensilado de sorgo forrajero (*Sorghum bicolor*), proporcionando una alternativa de producción de ensilados, de esta manera acelerar y tener un mejor control de la fermentación. Por lo tanto, el lactosuero tendría una vía de reutilización, disminuyendo el problema de la contaminación de esta zona, proporcionando un alimento funcional para el ganado vacuno.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

La adición de lactosuero y de la bacteria ácido láctica *L. rhamnosus* tienen efecto en el ensilado de sorgo forrajero (*Sorghum bicolor*).

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo General

Determinar el efecto del lactosuero y la bacteria ácido láctica *L. rhamnosus* en la fermentación de sorgo forrajero.

4.2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar los cambios microbiológicos en el ensilaje de sorgo forrajero con la adición de lactosuero y la bacteria ácido láctica *L. rhamnosus*.
2. Cuantificar la producción de ácidos orgánicos en el ensilaje de sorgo forrajero con la adición de lactosuero y la bacteria ácido láctica *L. rhamnosus*.
3. Verificar la calidad del ensilaje de sorgo forrajero con la adición de lactosuero y de la bacteria ácido láctica *L. rhamnosus*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Se utilizó forraje de sorgo picado, proporcionado por el Rancho Universitario, lactosuero ácido derivado de la producción de queso tipo Oaxaca, proporcionado por la empresa Prounilac y el cultivo liofilizado de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus rhamnosus* Holdbac de Danisco.



Figura 4. Cultivo de sorgo forrajero (*Sorghum bicolor*), donado por del Rancho Universitario.

5.2 Localización del experimento

La fase experimental se realizó en el período comprendido entre los meses de septiembre a diciembre de 2005, en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en el Laboratorio de Sistemas Agroalimentarios del Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología de Alimentos, en Tulancingo, Hidalgo.

5.3 Diseño de Experimentos

Se realizó un experimento, donde se probaron dos tratamientos, con cinco repeticiones cada uno, a cuatro tiempos diferentes, los cuales consistieron en utilizar forraje de sorgo proveniente de un solo corte. Al primer tratamiento se le adicionó lactosuero ácido estéril y al segundo tratamiento se le agregó lactosuero ácido inoculado con la bacteria ácido láctica *L. rhamnosus*. Realizando el muestreo a los 0, 30, 60, 90 días durante la fermentación.

Los resultados obtenidos fueron analizados, utilizando la prueba T de student ($\alpha = 0.05$), utilizada para comparar los valores de los dos tratamientos, con ayuda del paquete estadístico NCSS versión 6.03 (NCSS, 1997).

5.4 Condiciones de operación de los biorreactores

Los microsilos se realizaron en biorreactores de vidrio con tapadera con una capacidad aproximada de 5 Kg, cinco biorreactores por cada tratamiento, estos biorreactores fueron lavados y sanitizados en agua hirviendo previamente para evitar cualquier tipo de contaminación, como se observa en la figura 5. Se llenó cada biorreactor con el sorgo troceado. En una bandeja de plástico se vació el contenido de un biorreactor (sorgo forrajero troceado) y se agregaron 500 mL de lactosuero ácido estéril. Se movió vigorosamente hasta obtener una mezcla uniforme. Esta mezcla se colocó nuevamente en su biorreactor y se comprimió manualmente. Cada biorreactor se cerró herméticamente para evitar una fermentación aerobia. Este mismo procedimiento se realizó para el segundo tratamiento con lactosuero ácido inoculado con *L. rhamnosus*, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente por 30 días. Se realizó un muestreo sin reemplazo de 2 biorreactores, uno con lactosuero ácido y con lactosuero ácido inoculado con *L. rhamnosus*, descartándolos del proceso de fermentación.

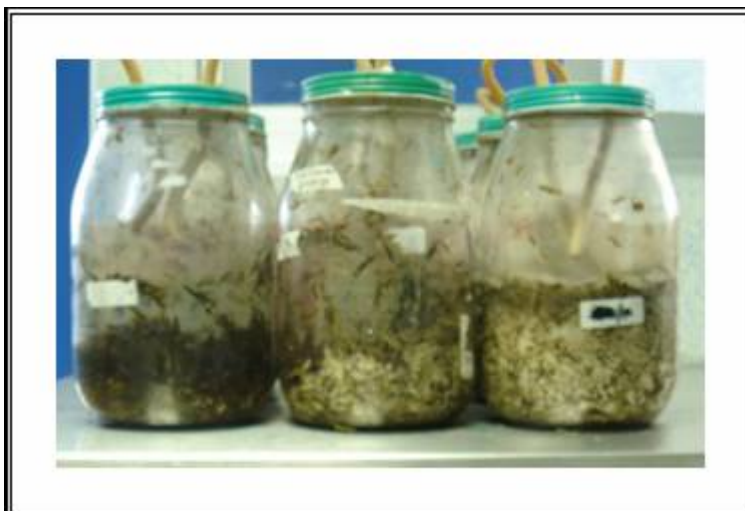


Figura 5. Biorreactores de laboratorio utilizados en la fase experimental.

5.5 Extracciones

En la primera quincena de cada mes, se muestrearon manualmente dos biorreactores, desechando la parte superior del ensilado (2 cm), mezclando uniformemente todo el material. Se tomaron aproximadamente 300 g de cada muestra y fueron depositadas en bolsas de polipapel que se ultracongelaron durante 4 meses. La muestra se descongeló, antes de iniciar los análisis de laboratorio. Se realizaron extractos mediante la técnica propuesta por Campos, M. R. G (2000). Se tomaron 10 g del material del biorreactor, adicionándoles 100 mL de agua destilada, manteniéndolas en agitación durante una hora. Posteriormente se filtró con una gasa y después en una bomba al vacío en papel Whatman No. 41, finalmente se filtró en membranas con tamaño de poros de 0.45 micrómetros.

5.6 Conteo en placa

Para realizar los estudios microbiológicos, se prepararon tres medios de cultivo, MRS (DIFCO) con Agar (HYCEL), Mc Conkey (BIOXON) y Estándar (BIOXON); en donde se pesaron las correspondientes cantidades de medio y se procedió a su preparación según lo especificado por el proveedor de los medios de cultivo ya mencionados, posteriormente se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos en el autoclave; el cultivo en placa se realizó en cajas petri desechables, cuantificando las UFC, con ayuda de un contador de colonias (Leica, 3327).

5.7 Determinación de ácidos orgánicos

La determinación de ácidos orgánicos se llevó a cabo en un equipo de electroforesis capilar (Beckman Coulter) con un capilar de silica fundida de 47 cm de 75 μm D.I. X 375 μm D. E., con una longitud de inyección a detección de 40 cm, con una presión de nitrógeno en el capilar. La lectura del detector UV se realizó a 214 nm. El método de electroforesis capilar consta de la electroseparación, en general se basa en la separación de los iones: los iones negativos tienden a migrar hacia el voltaje más alto y los iones positivos hacia el más bajo, sin importar que se encuentre en solución o en forma de gas, de ahí que, un cuerpo cargado se coloca sobre un campo eléctrico por lo que la velocidad promedio de migración es una especie de analito proporcional a la carga promedio del ion y también es proporcional al voltaje medio que se aplica. Es necesario amortiguar las soluciones que se separan para asegurar que la carga permanezca igual en cualquier medio ácido o básico, de ahí el empleo de amortiguadores. La electroforesis capilar separa los iones según sus diferentes relaciones de carga con respecto al tamaño (Manual de usuario Beckman Coulter).

El buffer que se utilizó para la determinación de ácidos orgánicos (ácido acético, propionico, butírico) fue una solución de ácido benzoico 10 mM, Histidina 10 mM y TTAB 1 mM ajustando el pH a 6.0 con una solución de NaOH 4 N. Las condiciones del capilar fueron 5 minutos para el enjuague con hidróxido de sodio, 5 minutos con agua y 5 minutos con el buffer. Entre dos inyecciones consecutivas, el capilar se dejaba equilibrar con buffer durante 10 segundos.



Figura 6. Equipo de Electroforesis Capilar Beckman Coulter.

5.8 Determinación de carbohidratos totales

En la cuantificación de azúcares totales se aprovechan las propiedades químicas específicas de los monosacáridos. Una vía muy general es la deshidratación, en caliente y en medio ácido, de los grupos hidroxilos, que conduce a la formación de compuestos intermedios como el furfural para las pentosas y el 5-hidroximetil furfural para las hexosas. Estos compuestos se pueden cuantificar directamente midiendo su absorbancia. En el método con reactivo de antrona (9,10-dihidro-oxoantraceno) los derivados condensados de ésta, dan un color azul verdoso cuya absorbancia se mide entre 580 y 625 nm.

Se tomo 1 mL de las extracciones y se le adicionó 2 mL de reactivo de antrona (200 mg de reactivo antrona y 100 mL de ácido sulfúrico concentrado) en un tubo de ensaye según la técnica de antrona, después se colocaron en baño María por 10 minutos. Se dejó enfriar y se leyó a 625 nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 5). Se interpolaron los resultados en una curva patrón (Figura 7), realizada con una solución madre de dextrosa a una concentración de 50 mg/L.

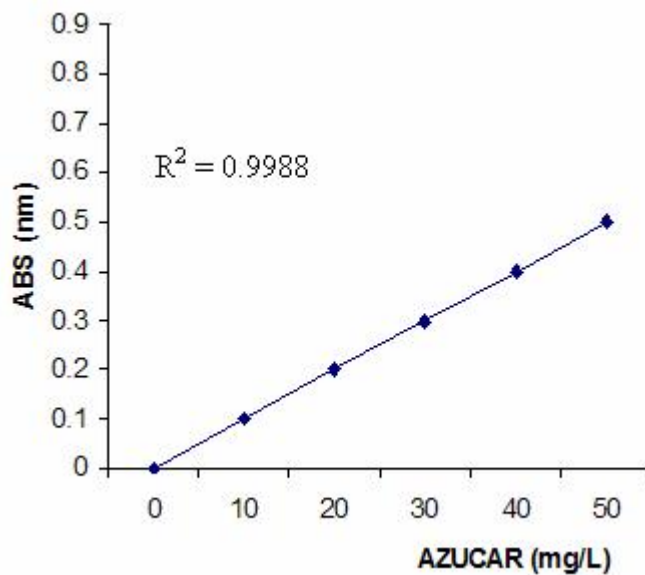


Figura 7. Curva patrón de azúcares

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis Microbiológicos

En los cuadros 5 y 6 se muestran los datos resultantes de los análisis microbiológicos para bacterias mesófilas, bacterias lácticas y enterobacterias, obtenidos durante el tiempo de ensilaje. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el tipo de bacterias y los días de fermentación.

Para el conteo de microorganismos mesófilos, estos datos representan la cantidad para el testigo de 2.99×10^6 a 2.58×10^5 y para *L. rhamnosus* de 1.50×10^6 a 1.41×10^5 a los 60 y 90 días de fermentación, respectivamente, de UFC/g de forraje fresco, suficientes para obtener los resultados deseados durante el proceso de ensilaje.

Cuadro 5. Bacterias mesófilas de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inoculo con la bacteria *L. rhamnosus*.

Tiempo (días)	Testigo (UFC /g de forraje fresco)	<i>L. rhamnosus</i> (UFC /g de forraje fresco)
0	1.65×10^{10}	4.63×10^{10}
30	1.72×10^9	4.08×10^9
60	2.99×10^6	1.50×10^6
90	2.58×10^5	1.41×10^5

La cantidad de UFC/g fue muy similar a lo reportado por Taylor, *et al* (2002) 4.0×10^5 UFC/g de forraje fresco, en donde realizó un estudio utilizando *L. buchneri* 40788 para determinar la fermentación de un ensilado de cebada.

Después de 90 días de fermentación, se muestran los datos obtenidos en el conteo de bacterias lácticas (cuadro 7), en donde se observa que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el testigo y el tratamiento inoculado con *L. rhamnosus*.

Cuadro 6. Bacterias lácticas de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inoculo con la bacteria *L. rhamnosus*.

Tiempo (días)	Testigo (UFC /g de forraje fresco)	<i>L. rhamnosus</i> (UFC /g de forraje fresco)
0	1.46×10^6	1.88×10^6
30	1.56×10^5	4.13×10^5
60	7.63×10^3	12.73×10^3
90	1.63×10^3	4.50×10^3

De acuerdo con los datos encontrados, la presencia de bacterias ácido lácticas en el lactosuero ácido utilizado como aditivo, no presenta una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre éste y el tratamiento inoculado con *L. rhamnosus*.

Los resultados de la población de coliformes (enterobacterias) se muestran en el cuadro 7, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el testigo y el tratamiento inoculado con *L. rhamnosus*, siendo muy pequeñas para que no afectan la composición y estabilidad anaerobia del ensilado. La cantidad más importante de enterobacterias encontradas fue a los 30 días de fermentación, en el testigo se encontraron 4.5×10^3 UFC/ g de forraje fresco y para el tratamiento inoculado con *L. rhamnosus* de 2.07×10^3 UFC /g de forraje fresco.

Cuadro 7. Enterobacterias de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inoculo con la bacteria *L. rhamnosus*.

Tiempo (días)	Testigo (UFC /g de forraje fresco)	<i>L. rhamnosus</i> (UFC /g de forraje fresco)
0	ND	ND
30	1.77×10^3	2.07×10^3
60	7.0×10^5	3.7×10^5
90	6.9×10^2	6.0×10^2

ND No detectado

6.2 Medición de pH

En el cuadro 8 se puede apreciar el pH a diferentes tiempos de fermentación, el pH inicial fue mejor en el tratamiento inoculado con *L. rhamnosus*. Posteriormente hay un incremento de pH, probablemente debido a la apertura de los microsillos, para muestreo y posterior análisis.

Cuadro 8. pH a diferentes tiempos de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inoculo con la bacteria *L. rhamnosus*.

Tiempo (días)	Testigo	<i>L. rhamnosus</i>
0	5.63	4.14
30	7.69	7.79
60	7.96	7.79
90	8.86	7.81

Danner *et al* (2002) reporta que el ensilado de cultivo de maíz tuvo un pH de aproximadamente 3.8, los ensilados inoculados con bacterias homofermentativas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. plantarum*) tenían valores de pH alrededor de 3.8. El pH final de los ensilados inoculados con *L. buchneri* fue de 4.11.

Cai, *et al* (1999), a los 40 días de fermentación, todos los ensilados de alfalfa, pasto italiano y sorgo, tratados con bacterias ácido lácticas fueron bien preservados, con un valor de pH de 3.5.

En el estudio realizado por Taylor *et al* (2001) evidenciaron que cuando se aplico *L. buchneri* 40788 provee al ensilado estabilidad aerobia. El ensilado a nivel laboratorio tuvo el valor de pH de 4.37. Filya (2003b), determina que después de 90 días de ensilaje, los ensilados inoculados con *L. buchneri* tuvieron el pH más alto de 3.8 ($P < 0.05$).

Ranjit y Kung (1999) determinaron que los inoculantes con varias cepas de *L. plantarum* o *L. buchneri* utilizados en ensilados de maíz numéricamente fueron los más bajos en concentraciones de lactato, amonio y etanol, pero ninguna de estas diferencias fueron estadísticamente diferentes. El mecanismo de acción el cual provee estabilidad aerobia determinada por una extensiva fermentación heteroláctica, los valores de pH variaron de 3.67 a 3.70 y 3.72. Adesogan *et al* (2002) determinaron que todos los tratamientos inoculados, que contenían obligatoriamente bacterias heterofermentativas como aditivos redujeron el pH (3.7), nivel en el que se detiene el crecimiento de microorganismos indeseables.

6.3 Determinación de la concentración de ácidos orgánicos

Durante el proceso de fermentación se obtuvieron diferentes compuestos, evaluándose las concentraciones de ácido láctico, ácido acético y ácido butírico. El ensilado inoculado con *L. rhamnosus* tuvo un contenido en ácido láctico de 12.12 g durante los 0 y 30 días de fermentación, aumentando la concentración a 64.58 g ($P > 0.05$) a los 60 – 90 días de fermentación. En cuanto al contenido de ácido acético, tuvo 4.36 g entre los 0 y 30 días de fermentación, disminuyendo la concentración a 1.45 g ($P > 0.05$) durante los 60 y 90 días de fermentación.

El tratamiento sin inocular registró un contenido de ácido láctico de 9.86 g durante los 0 y 30 días de fermentación, a los 60 – 90 días de fermentación, la concentración de ácido láctico aumento a 58.94 g ($P > 0.05$). En lo referente al contenido de ácido acético se encontraron 13.32 g en los 0 – 30 días de fermentación, posteriormente disminuye la concentración durante los 60 – 90 días encontrándose 10.93 g ($P > 0.05$). Todas las cantidades están cuantificadas en base a la materia seca (g / Kg de materia seca).

Cuadro 9 Concentración de ácido láctico y ácido acético en el tratamiento inoculado y sin inóculo con *Lactobacillus rhamnosus*.

	Ácido Láctico (g/Kg materia seca)		Ácido Acético (g/Kg materia seca)	
	0-30 (días)	60-90 (días)	0-30 (días)	60-90 (días)
<i>L. rhamnosus</i>	12.12	64.58	4.36	13.32
Testigo	9.86	58.94	1.45	10.93

No se detectaron concentraciones de ácido butírico ni de amonio ($P > 0.05$) durante todo el período que duró la fermentación del proceso de ensilaje.

En el cuadro 9, se observa que en los dos tratamientos estudiados, existe una alta producción de ácido láctico promovida por la utilización inoculante de la bacteria ácido láctica *L. rhamnosus*, en comparación con las concentraciones de ácido acético, que fueron disminuyendo durante el periodo de ensilado.

Cuadro 10. Concentración de ácidos orgánicos totales de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inóculo con la bacteria *L. rhamnosus*.

Ácidos Orgánicos Totales (g / Kg de materia seca)		
Tiempo (días)	Testigo	<i>L. rhamnosus</i>
0 – 30	23.18	16.49
60 - 90	69.88	66.03

Cai, *et al* (1999), reportaron contenidos de ácido acético y amonio N bajos ($P < 0.05$), y contenidos de ácido láctico (18.5 – 55.5 g /Kg de materia seca) más altos ($P < 0.05$), que el ensilado control.

Filya (2003b), después de 90 días de ensilaje, encontró que los ensilados inoculados con *L. plantarum* o *L. buchneri* + *L. plantarum* tuvieron el contenido más alto de ácido láctico (2.54 - 9.39 g /Kg de materia seca) que el control y los ensilados inoculados solo con *L. buchneri* (P<0.05). Se registraron niveles más altos y tardíos de ácido acético (0.33 - 4.30 g /Kg de materia seca) (P<0.05).

Ranjit y Kung (1999) determinaron que los inoculantes con varias cepas de *L. plantarum* o *L. buchneri* utilizados en ensilados de maíz numéricamente fueron los más bajos en concentraciones de lactato, amonio y etanol, pero ninguna de estas diferencias fueron estadísticamente diferentes. Las concentraciones de ácido láctico estuvieron determinados por la utilización de estas dos BAL y su mezcla (72.7; 66.2; 72.2 g /Kg de materia seca), los niveles de ácido acético (20.4; 45.4; 21.8 g /Kg de materia seca).

6.4 Concentración de carbohidratos hidrosolubles

Como se observa en el cuadro 11 durante la etapa de los 0 – 30 días de ensilaje, la mayor cantidad de carbohidratos hidrosolubles (P>0.05), se presenta en el tratamiento sin inocular 32.69 g / Kg de materia seca, mientras que en el tratamiento inoculado con *L. rhamnosus* fue de 29.72 g / Kg de materia seca, para el mismo período de tiempo.

Posteriormente en los 60 – 90 días de fermentación el tratamiento inoculado con *L. rhamnosus*, presenta un contenido de carbohidratos hidrosolubles 9.76 g / Kg de materia seca. El ensilado sin inocular al finalizar el período de fermentación presenta 1.67 g / Kg de materia seca de carbohidratos hidrosolubles, debido a la fermentación heteroláctica.

Cuadro 11. Azúcares totales de un ensilado de sorgo forrajero inoculado y sin inoculo con la bacetria *L. rhamnosus*.

Carbohidratos Hidrosolubles (g / Kg de materia seca)		
Tiempo (días)	Testigo	<i>L. rhamnosus</i>
0 – 30	32.69	29.72
60 - 90	1.67	9.76

En el estudio que realizaron Cai, *et al* (1999), reportan que el contenido de carbohidratos hidrosolubles fueron de 11.8 – 38.0 (g /Kg de materia seca), más altos ($P < 0.05$), que el ensilado control. Para Filya (2003b), a los 90 días de ensilaje, el control y los ensilados inoculados con *L. plantarum* contenían más carbohidratos hidrosolubles residuales (0.64 – 5.96 g /Kg de materia seca) que los ensilados inoculados con *L. buchneri* y *L. buchneri* + *L. plantarum* ($P < 0.05$).

Adesogan *et al* (2002) determinaron que todos los tratamientos inoculados, contenían obligatoriamente bacterias heterofermentativas que usaron la vía 6-fosfogluconato / fosfoquetolasa para fermentar los carbohidratos hidrosolubles en acetato y etanol, produjeron carbohidratos hidrosolubles residuales de 20 g /Kg de materia seca.

7. CONCLUSIONES

1. Se observó una fermentación heteroláctica en ambos tratamientos.
2. El lactosuero proporcionó los carbohidratos para estimular la fermentación heteroláctica.
3. El lactosuero estimuló el crecimiento de las bacterias lácticas nativas en el sorgo forrajero. En un nivel en el que no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) con el tratamiento de lactosuero con *Lactobacillus rhamnosus*.
4. El pH no fue el idóneo para un buen ensilado, ya que se incrementó a más de 7, debido a la apertura del silo.

8. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda lo siguiente para el futuro:

- Cuando se trabaje con microsilos (biorreactores) en cada muestreo utilizar un microsililo, para que no se altere el microcosmos.
- Realizar un estudio a nivel piloto para comprobar la factibilidad del ensilado adicionado con lactosuero.

9. REFERENCIAS

Abdelhadi, L. O., Santini, F. J. (2006). Corn silage versus grain sorghum silage as a supplement to growing steers grazing high quality pastures: effect on performance and ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 127: 33 – 43.

Adesogan, A. T., Salawu, M. B., Ross, A. B., Davies, D. R., Brooks, A. E. (2003). Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* inoculants, or a chemical additive on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of crimped wheat grains. *Journal of Dairy Science*. 86: 1789 – 1796.

Anders, R. F., Hogg, D. M., Jago, G. R. (1970). Formation of hydrogen peroxide by group N streptococci and its effect on their growth and metabolism. *Appl. Microbiol.* 19:608–612.

Ashbell, G., Kipnis, T., Titterton, M., Hen, Y., Azrieli, A., Weinberg, Z. G. (2001). Examination of a technology for silage making in plastic bags. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 213 – 222.

Axelsson, L.T. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects, Second Edition. Pp. 1-72.

Bolsen, K., Ilg, H., Pope, R., and Hoover, J. (1983). Whole plant forage, grain and nonheading sorghum silages, cornlage, and feed flavor supplements for growing calves. In: Cattlemen's Day 1983. Kansas Agric. Exp. Stn. Rep. Prog. 427.

Burns, J. C., Kimbrough, E. L. (1981). Quality estimates and chemical characterization of fermented and unfermented summer annual forages. *Agron.* 40: 908 – 915.

Cai, Y., Benno, Y., Ogawa, M., Kumai, S. (1999). Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *Journal of Dairy Science*. 82: 520 – 526.

Calabró, S., Cutrignelli, M. I., Piccolo, G., Bovera, F., Zicarelli, F., Gazaneo, M. P., Infascelli, F. (2005). *In Vitro* fermentation kinetics of fresh and dried silage. *Animal Feed Science and Technology*. 123 - 124: 129 – 137.

Campos – Montiel, R. 2000. Caracterización y fraccionamiento de compuestos activos con efectos prebióticos contenidos en cultivos fúngicos. Tesis de doctorado. Unidad académica de ciclo de profesionales y de postgrado. UNAM México. 55 p.

Campos, M.R.G., Hernández, F. A., Rodríguez, H. A. I., y Chavarría, H. N. (2003). Diagnóstico de la problemática del lactosuero en el Valle de Tulancingo Hgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Colombatto, D., Mould, F. L., Bhat, M. K., Phipps, R. H., Owen, E. (2004a). *In vitro* evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage I. effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Animal Feed Science and Technology*. 111: 111 – 128.

Colombatto, D., Mould, F. L., Bhat, M. K., Phipps, R. H., Owen, E. (2004b). *In vitro* evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage II. effects on rate of acidification, fiber degradation during ensiling and rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 111: 129 – 143.

Cherney, D. J. R., Cherney, J. H., Cox, W. J. (2004). Fermentation characteristics of corn forage ensiled in mini – silos. *Journal of Dairy Science*. 87: 4238 – 4246.

Danner, H., Holzer, E., Mayhuber, E., Braun. R. (2003). Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69. Pp. 562 – 567.

De Man, J.D. Rogosa, M., Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 23; 130 – 135.

Ferreira, G., Mertens, D.R. (2005). Chemical and physical characteristics of corn silage and their effects on *in vitro* disappearance. *Journal of Dairy Science*. 88: 4414 – 4425.

Filya, I. (2003 a). Nutritive value of whole crop wheat silage harvested at three stages of maturity. *Animal Feed Science and Technology*. 103: 85 – 95.

Filya, I. (2003 b). The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*. 86: 3575 – 3581.

Harrison, J.H., Fransen, S. (1991). Silage management in North America. Field Guide for Hay and Silage Management in North America. K. K. Bolsen. Ed. Natl. Feed Ingredients Assoc. West Des Moines, Iowa. Pp. 33.

Hayashi, K.J. 1990. Effects of the colour and thickness of polyethylene film on ensiling conditions and silage quality of chopped maize, as investigated under ambient conditions and in mini – silos. *Dairy Sci.* 73: 579 – 583.

Holzter, M., Mayrhuber, E., Danner, H., Braun, R. (2003). The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology.* 21 (6): 282 – 287.

Ibar, A. L. (1984). *Sorgo Cultivo y Aprovechamiento*. Biblioteca Agrícola AEDOS. Barcelona. Primera Edición. Pp: 141- 168.

Johnson, L., Harrison, J.H., Hunt, C., Shinnors, K., Doggett, C.G., Sapienza, D. (1999). Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical processing: A contemporary review. *Journal of Dairy Science.* 82: 2813 – 2825.

Johnson, L. M., Harrison, J. H., Davidson, D., Mahanna, W. C., Shinnors, K. (2001). Corn silage management: effects of maturity, inoculation, and mechanical processing on pack density and aerobic stability. *Journal of Dairy Science.* 85: 434 – 444.

Johnson, L. M., Harrison, J. H., Davidson, D., Mahanna, W. C., Shinnors, K. (2002). Corn silage management effects of hybrid, maturity, inoculation, and mechanical processing on fermentation characteristics. *Journal of Dairy Science.* 86: 287 – 308.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 49: 209 – 224.

Kandler, O. (1984). Current taxonomy of lactobacilli. *Developments in Industrial Microbiology.* 25: 109 – 123.

Kandler, O., N. Weiss. (1986). Regular non-sporing Gram positive rods. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Pages 1208–1234

Kung, L. Jr., Whiter, A.G., (2001). The effect of a dry or liquid application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the Fermentation of Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science.* 84: 2195 – 2202.

Kurmann, J. A., Rasic, J. L. (1978). *Yoghurt: Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations*. *Technical Dairy Publishing House, Vanlose, Copenhagen, Denmark.*

Leinbensperger, R. Y., Pitt, R. E. (1987). A model of Clostridial Dominance *In* Ensilage, *Grass and Forage Sci.* 44: 19 – 25.

Moss, B. R., Reeves, D. W., Lin, J. C., Torbert, H. A., McElhenney, W. H., Mask, P., Kezar, W. (2001). Yield and quality of three corn hybrids as affected by broiler litter fertilization and crop maturity. *Animal Feed Science and Technology*. 94: 43 – 56.

Muller, A., Daufin, G., Chaufer, B. 1999. Ultrafiltration modes of operation for the separation of alfa lactalbumin from acid casein whey. *Journal of Membrane Science*, 153: 9- 21.

Narayanan, N. Roychoudhurg, P.K., Srivastava, A. (2004). Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L (+) lactic acid. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7 (1): 72 – 84.

Neylon, J. M., Kung, L. Jr., (2003). Effects of cutting height and maturity on the nutritive value of corn silage for lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 86: 2163 – 2169

Oelberg, T. J., Clark, A. K., McGuffey, R. K., Schingoethe, D. J. (1983). Evaluation of covering, dry matter and preservative at ensiling of alfalfa in bunker silos. *Journal of Dairy Science*. 66: 1057 – 1068.

Owen, F.G., Moline, W.J. (1970). Sorghum for forage. In: Sorghum Production and Utilization. J.S. Wall and W. M. Ross, eds. AVI Plub. Co., Wesport, CT. Pp. 382 – 415.

Pitt, R. E. (1991). Hay preservation and hay additive products. Field guide for Hay and Silage Management in North America. K. K. Bolsen. Ed. Natl. Feed Ingredients Assoc. West Des Moines, Iowa. Pp. 127.

Ranjit, N. K., Kung, L. Jr. (2000). The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*. 83: 526 – 535.

Ritchie, H. D., Woodburn, D.A., Dingerson, R. L., Henderson, H. E., Wooby, H. D., Strohhahn, D. R. (1972) Wintering pregnant heifers in dry lot on two varieties of sorghum silage and two sources of supplemental nitrogen. Mich. Agric. Exp. Stn. Res. Rep. 174.

Satter, L. D., Muck, R. E., Woodford, J. A., Jones, B. A., Wacek, C. M. (1988). Proc. Of the Wisconsin forage Council's 12th forage production and use symposium.

Slotner, D., Bertilsson, J. (2006). Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology*. 127: 101 – 111.

Spreer, E. (1991). El lactosuero y su aprovechamiento en Lactología Industrial. Ed. Acribia. España. Pp. 527 – 549.

Taylor, C. C., Kung, L. Jr., Ranjit, N. J., Mills, J. A., Neylon, J. M. (2002). The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 85: 1793 – 1800.

Vanbelle, M., Bertin. G. (1985). L'ensilage, aspect biologiques nouveaux. Université de Louvain, Faculté des Sciences Agronomiques, Place croix du Sud, 3 Louvain La Neuve, 1348, Belgium.

Ward, G. M., Smith, E. F. (1968). Nutritive value of sorghum silage as influenced by grain content. *Journal of Dairy Science*. 51: 1471 – 1473.

Weinberg, Z.G., Ashbell, G. (2003). Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 181 – 188.

Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Chen, Y. (2003). Stabilization of returned dairy products by ensiling with straw and molasses for animal feeding. *Journal of Dairy Science*. 86: 1325 – 1329

Worobo, R.W., Kim, S.H., Oh, S. (2000). Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *Journal of Dairy Science*. 83: 2747 – 2752.

Winters, A. L., Lloyd, J. D., Jones, R., Merry, R. J. (2002). Evaluation of a rapid method for estimating free amino acids in silages. *Animal Feed Science and Technology*. 99: 177 – 187.

Yahaya, M. S., Kawai, M., Takahashi, J., Matsuoka, S. (2002). The effect of different moisture contents at ensiling on silo degradation and digestibility of structural carbohydrates of orchardgrass. *Animal Feed Science and Technology*. 101: 127 – 133.

Yang, X., Chen, H., Gao, H., Li, Z. (2001). Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid – state fermentation. *Bioresource Technology*. 78: 277 – 280.

10. ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico de la prueba T de student para los resultados obtenidos de carbohidratos totales durante la fase experimental.

Two-Sample Test Report

Descriptive Statistics Section

Variable	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
C1=1	4	7.807778	6.162446	3.081223	-1.998048	17.61361
C1=2	4	5.695615	7.093764	3.546882	-5.592146	16.98338

Note: T-alpha (C1=1) = 3.1824, T-alpha (C1=2) = 3.1824

Confidence-Limits of Difference Section

Variance Assumption	DF	Mean Difference	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
Equal	6	2.112163	6.644443	4.69833	-9.384237	13.60856
Unequal	5.88	2.112163	9.396661	4.69833	-9.438937	13.66326

Note: T-alpha (Equal) = 2.4469, T-alpha (Unequal) = 2.4586

Equal-Variance T-Test Section

Alternative Hypothesis	T-Value	Prob Level	Decision (5%)	Power (Alpha=.05)	Power (Alpha=.01)
Difference <> 0	0.4496	0.668814	Accept Ho	0.066923	0.014574
Difference < 0	0.4496	0.665593	Accept Ho	0.020288	0.003555
Difference > 0	0.4496	0.334407	Accept Ho	0.106792	0.024692

Difference: (C1=1)-(C1=2)

Anexo 2. Análisis estadístico con la prueba T de student para los resultados obtenidos de la medición de pH durante la fase experimental.

Two-Sample Test Report

Descriptive Statistics Section

Variable	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
C1=1	4	7.07	2.001316	1.000658	3.885459	10.25454
C1=2	4	7.2975	1.114252	0.5571262	5.524476	9.070524

Note: T-alpha (C1=1) = 3.1824, T-alpha (C1=2) = 3.1824

Confidence-Limits of Difference Section

Variance Assumption	DF	Mean Difference	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
Equal	6	-0.2275	1.619695	1.145297	-3.029942	2.574942
Unequal	4.70	-0.2275	2.290595	1.145297	-3.229665	2.774665

Note: T-alpha (Equal) = 2.4469, T-alpha (Unequal) = 2.6213

Equal-Variance T-Test Section

Alternative Hypothesis	T-Value	Prob Level	Decision (5%)	Power (Alpha=.05)	Power (Alpha=.01)
Difference <> 0	-0.1986	0.849105	Accept Ho	0.053283	0.010871
Difference < 0	-0.1986	0.424553	Accept Ho	0.071134	0.015145
Difference > 0	-0.1986	0.575447	Accept Ho	0.034176	0.006437

Difference: (C1=1)-(C1=2)

Anexo 3. Análisis estadístico con la prueba T de student para los resultados obtenidos de la medición de ácido láctico durante la fase experimental.

Two-Sample Test Report

Descriptive Statistics Section

Variable	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
C1=1	4	98.00261	189.8154	94.90768	-204.036	400.0412
C1=2	4	196.8832	370.6186	185.3093	-392.8538	786.6201

Note: T-alpha (C1=1) = 3.1824, T-alpha (C1=2) = 3.1824

Confidence-Limits of Difference Section

Variance Assumption	DF	Mean Difference	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
Equal	6	-98.88056	294.4385	208.1994	-608.3262	410.5651
Unequal	4.47	-98.88056	416.3989	208.1994	-653.6282	455.867

Note: T-alpha (Equal) = 2.4469, T-alpha (Unequal) = 2.6645

Equal-Variance T-Test Section

Alternative Hypothesis	T-Value	Prob Level	Decision (5%)	Power (Alpha=.05)	Power (Alpha=.01)
Difference <> 0	-0.4749	0.651629	Accept Ho	0.068904	0.015123
Difference < 0	-0.4749	0.325815	Accept Ho	0.111007	0.025887
Difference > 0	-0.4749	0.674185	Accept Ho	0.019196	0.003340

Difference: (C1=1)-(C1=2)

Anexo 4. Análisis estadístico con la prueba T de student para los resultados obtenidos de la medición de ácido acético durante la fase experimental.

Two-Sample Test Report

Descriptive Statistics Section

Variable	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
C1=1	4	1.811527	2.984021	1.492011	-2.936716	6.559771
C1=2	4	3.705097	3.896978	1.948489	-2.495864	9.906059

Note: T-alpha (C1=1) = 3.1824, T-alpha (C1=2) = 3.1824

Confidence-Limits of Difference Section

Variance Assumption	DF	Mean Difference	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
Equal	6	-1.89357	3.47065	2.45412	-7.898585	4.111445
Unequal	5.62	-1.89357	4.90824	2.45412	-7.998969	4.211829

Note: T-alpha (Equal) = 2.4469, T-alpha (Unequal) = 2.4878

Equal-Variance T-Test Section

Alternative Hypothesis	T-Value	Prob Level	Decision (5%)	Power (Alpha=.05)	Power (Alpha=.01)
Difference <> 0	-0.7716	0.469646	Accept Ho	0.100483	0.024240
Difference < 0	-0.7716	0.234823	Accept Ho	0.169124	0.043704
Difference > 0	-0.7716	0.765177	Accept Ho	0.009703	0.001558

Difference: (C1=1)-(C1=2)

Anexo 5. Análisis estadístico con la prueba T de student para los resultados obtenidos de la medición de ácidos orgánicos totales, durante la fase experimental.

Two-Sample Test Report

Descriptive Statistics Section

Variable	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
C1=1	4	200.5883	368.1289	184.0645	-385.187	786.3635
C1=2	4	99.81413	188.6134	94.3067	-200.3119	399.9402

Note: T-alpha (C1=1) = 3.1824, T-alpha (C1=2) = 3.1824

Confidence-Limits of Difference Section

Variance Assumption	DF	Mean Difference	Standard Deviation	Standard Error	95% LCL of Mean	95% UCL of Mean
Equal	6	100.7741	292.4841	206.8175	-405.2901	606.8383
Unequal	4.47	100.7741	413.635	206.8175	-450.2491	651.7974

Note: T-alpha (Equal) = 2.4469, T-alpha (Unequal) = 2.6643

Equal-Variance T-Test Section

Alternative Hypothesis	T-Value	Prob Level	Decision (5%)	Power (Alpha=.05)	Power (Alpha=.01)
Difference <> 0	0.4873	0.643363	Accept Ho	0.069907	0.015401
Difference < 0	0.4873	0.678319	Accept Ho	0.018684	0.003239
Difference > 0	0.4873	0.321681	Accept Ho	0.113098	0.026484

Difference: (C1=1)-(C1=2)