



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales

TESIS DE LICENCIATURA

**Evaluación microbiológica y fisicoquímica del efecto de aditivos
de bacterias ácido lácticas en el ensilado de maguey (guishe).**

Para obtener el grado de

Licenciada en Ingeniería en Biotecnología

PRESENTA

Mayra Noemi Avila Carrillo

Fecha 13 de octubre de 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
 Instituto de Ciencias Agropecuarias
Institute of Agricultural Sciences

Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo, a 13 de octubre de 2025
Numero de Control: IBT-Aut-004-2025
Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado al pasante de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, **Mayra Noemi Avila Carrillo**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado **“Evaluación microbiológica y fisicoquímica del efecto de aditivos de bacterias ácido lácticas en el ensilado de maguey (guishe).”**, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

PRESIDENTE Dr. Cristian Raziel Delgado González
SECRETARIO Mtro. Fred Eduardo Hernández Perea
VOCAL 1 Dr. Alfredo Madariaga Navarrete
VOCAL 2 Mtro. Luis González de la Rosa

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”


Dr. Paul Misael Garza López
 Coordinador del Ingeniería en Biotecnología


Dr. Armando Peláez Acero
 Director del Instituto de Ciencias Agropecuarias



Avenida Universidad #133, Col. San Miguel Huatengo. C.P. 43775. Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo, México.
 Teléfono: 7717172000 Ext. 42000
 pelaeza@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Tabla de contenido

1. Resumen	5
Abstract	5
2. Introducción	6
2.1 Agave	7
2.2 Agave salmiana	9
2.3 Ensilado	13
2.4 Fases del ensilado	15
2.4.1 Fase aeróbica	16
2.4.2 Fase de fermentación	18
2.4.3 Fase estable	21
2.4.4 Fase de alimentación	22
Perfil del ensilado	24
2.5 Perfil microbiológico	24
2.5.1 Bacterias del ácido láctico	24
2.5.2 Bacterias del ácido propiónico	37
2.5.3 Enterobacterias	38
2.5.4 Bacterias formadoras de esporas	38
2.5.5 Listeria	39
2.5.6 Bacterias del ácido acético	40
2.5.7 Levaduras	41
2.5.8 Mohos	42
2.6 Físicoquímica del ensilaje	43
2.6.1 Materia seca	43
2.6.2 Azúcares	44
2.6.3 pH	45
2.6.4 Ácido láctico	46
2.6.5 Ácidos volátiles	48
2.6.6 Proporción ácido láctico: ácido acético	49
2.6.7 Nitrógeno soluble y N amoníaco	49
2.6.8 Olor del ensilado	50
2.6.9 Saponinas	50

2.6.10 Oxalatos.....	52
3. Antecedentes.....	54
3.1 Ecología de las Bacterias Ácido Lácticas.....	54
3.2 Aplicaciones en la industria alimentaria y agrícola.....	55
3.3 Aditivos en los ensilados	58
3.3.1 Clasificación	59
3.3.2 Importancia	65
3.4 Aditivos microbiológicos BAL	66
3.5 Inoculación epífita y exógena	71
Objetivos.....	74
Objetivo general	74
Objetivos específicos.....	74
Hipótesis.....	74
Hipótesis nula	74
Hipótesis alternativa.....	75
Justificación	75
I. Producción de inóculos de <i>Lactobacillus pantheris</i>	77
Materiales y métodos	77
Análisis estadísticos descriptivos.....	78
Resultados y discusiones.....	79
II. Ensilado: proceso y análisis de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos	81
Materiales y métodos	81
Preparación del ensilado.....	82
Preparación de los aditivos microbiológicos	82
Recolección de muestras.....	82
Aislamiento e identificación de microorganismos.....	83
Análisis de parámetros fisicoquímicos	84
Pérdida de materia orgánica por liberación de CO ₂	84
Materia seca.....	85
Azúcares reductores	85
pH	87
L-lactato	87
Saponinas.....	88

Oxalatos	90
Resultados y discusiones	90
Cinéticas de crecimiento microbiano	90
Pérdida de materia orgánica por liberación de CO₂	96
Materia seca	98
Azúcares reductores	100
pH	103
L-lactato	106
Saponinas	109
Oxalatos	111
Conclusiones	114
Financiamiento	115
Resumen de datos	116
Anexos	117
Preparación de Buffer de fosfatos (PBS)	117
Reactivación de la cepa CM4	118
Pérdida de materia orgánica por CO₂	119
Materia seca	120
Azúcares reductores	121
pH	122
L-lactato	123
Saponinas	124
Oxalatos	125
Referencias	126

1. Resumen

Este trabajo de investigación presenta la evaluación del efecto de dos aditivos microbiológicos de bacterias ácido lácticas en el ensilado de *Agave salmiana*. A través de ensayos de laboratorio, se utilizaron: una cepa nativa de *Lactobacillus pantheris* (CM4), aislada de ensilados finales de agave y un aditivo comercial para ensilados mixto de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*, para ello se realizaron cinéticas microbiológicas y se cuantificaron parámetros fisicoquímicos como pH, pérdida de materia orgánica, saponinas, oxalatos, concentración de azúcares reductores y acumulación de lactato. Los resultados demostraron que la adición de CM4 mejora el ensilado, con una disminución considerable de pH, azúcares reductores y saponinas, y, por ende, una mayor producción de lactato, promoviendo condiciones favorables para la conservación del material vegetal.

Palabras clave: Aditivos microbiológicos, ensilado, *Agave salmiana*, BAL, *Lactobacillus pantheris*.

Abstract

This thesis evaluated the effect of two lactic acid bacteria additives on *Agave salmiana* silage. Through laboratory tests, an isolated native strain of *Lactobacillus pantheris* (CM4) and a mixed commercial brand of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* were explored, microbiological kinetics were carried out and physicochemical parameters such as pH, organic matter loss, saponins, oxalates and reducing sugars concentration and lactate accumulation were quantified. The results showed that the addition of CM4 improves silage, with a considerable decrease in pH, soluble sugars and saponins, with a greater production of lactate, promoting favorable conditions for plant material conservation.

Keywords: Microbial additives, silage, *Agave salmiana*, LAB, *Lactobacillus pantheris*.

2. Introducción

El ensilado es una técnica de conservación de forrajes y residuos vegetales que permite mantener su valor nutricional mediante un proceso de fermentación anaeróbica. Este método ha sido ampliamente utilizado en la agricultura para asegurar una fuente constante de alimento para el ganado, especialmente durante épocas de escasez. Sin embargo, el éxito del ensilado depende en gran medida de las condiciones microbiológicas que se desarrollan durante el proceso. La presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) es esencial para la acidificación del medio y la inhibición de microorganismos indeseables, como coliformes y levaduras, que pueden afectar la calidad del ensilado. La comprensión de los microorganismos implicados en este proceso ha permitido optimizar prácticas de fermentación en el mismo.

El objetivo de este trabajo de investigación se centra en la evaluación de inóculos de bacterias ácido lácticas en ensilado de *Agave salmiana*, una planta de importancia económica, gastronómica y cultural en México, así mismo se aborda la cuantificación de compuestos clave, como el lactato, saponinas y azúcares reductores, además de la medición de parámetros como el pH y la pérdida de materia orgánica por liberación de CO₂. Estos estudios permiten evaluar la eficacia de los inóculos en el ensilado de *A. salmiana*, contribuyendo así al desarrollo de estrategias más eficientes para su conservación.

2.1 Agave

Los agaves pertenecen a la familia Agavaceae, siendo plantas perennes, hermafroditas y monocotiledóneas, cuyo ciclo de vida es de entre 7 y 12 años (Campos-Herrera *et al.*, 2025). Además, son plantas xéricas que se han adaptado a climas desfavorables y suelos pobres, largos períodos de sequía y altas temperaturas, por ello, están presentes de forma más común en zonas desérticas y semidesérticas del continente americano, están provistas de hojas suculentas en posición helicoidal desde la base del tallo, que puede ser corto o largo. Sin embargo, presentan características morfológicas variadas según la especie (Bethsua Mendoza Mendoza & Brianda Susana Velázquez de Lucio, 2023).

El género *Agave* comprende 210 especies y es endémico del continente americano. México es considerado el centro de origen y domesticación de los agaves, teniendo 159 especies presentes en su territorio, de las cuales, 129 son endémicas del país (Santiago-Martínez *et al.*, 2023). Su importancia radica principalmente en su utilidad como alimento para humanos, y son mayormente conocidas en su uso para la producción de bebidas alcohólicas (pulque, tequila y mezcal) y bebidas frescas (aguamiel), uso medicinal, extracción de jarabes altos en fructosa, forraje, la obtención de fibras vegetales e inclusive su uso como cercas vivas; desempeñando un papel clave en los pueblos a nivel local y regional de México (Bernardino-Nicanor & González-Cruz, 2023).

La obtención de estos valiosos productos, se asocia estrechamente a la condición fisiológica de estas plantas, ya que poseen el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). El azúcar, los compuestos medicinales y las vitaminas beneficiosas para los humanos son posibles gracias al almacenamiento de carbohidratos solubles y compuestos secundarios en las grandes vacuolas de estas plantas suculentas. Estas grandes vacuolas permiten un ciclo de carbono de 24 horas, fundamental para las plantas CAM, sus estructuras foliares están adaptadas para mantener la rigidez y la presión de turgencia en condiciones de sequía y calor extremos. La eficiencia en el uso del agua asociada a este tipo de plantas es posible gracias tanto

al almacenamiento de agua como al aislamiento hidráulico de las plantas, lo que requiere fibras fuertes pero flexibles para soportar la masa de agua en su interior, a la vez que evita el contacto entre el tejido vegetal y el suelo. Las largas fibras celulósicas que sostienen esta estructura foliar son ideales para tejer textiles y cuerdas (Davis & Ortiz-Cano, 2023).

Esta planta representa un recurso de alta importancia económica, ecológica, cultural y nutricional en México desde la época prehispánica y, durante la época colonial, se convirtió en una importante agroindustria para la economía del país (Blas-Yañez & Thomé-Ortiz, 2021). Su historia cultural, política, ecológica y agronómica sugiere el potencial de los agaves para proporcionar recursos agrícolas resilientes al clima. La eficiencia en el uso del agua, la tolerancia al calor, posibilitadas por su fisiología CAM, han permitido a las especies de agave abastecer a los seres humanos durante miles de años y estas características siguen siendo prometedoras para un futuro con un clima cambiante (Davis & Ortiz-Cano, 2023).

La rica historia de este género se presta, por lo tanto, a un modelo emergente de redescubrimiento de recursos naturales a través del conocimiento ecológico tradicional. Este redescubrimiento tiene el poder de orientar las estrategias de diversificación para una agricultura sostenible ante las condiciones climáticas cambiantes (Davis & Ortiz-Cano, 2023). La investigación sobre los usos actuales y potenciales de los agaves se ha llevado a cabo con una variedad de enfoques: 1) su importancia en los sistemas agroforestales de México; 2) prácticas de recolección, manejo y domesticación en Mesoamérica; 3) su uso en la elaboración de bebidas destiladas y tradicionales; 4) su contenido en compuestos bioactivos como los fructanos y otros prebióticos; 5) los aspectos biológicos, ecológicos y medicinales de especies específicas; 6) el estado de conservación y genética de los agaves mexicanos; 7) los usos socioeconómicos y agroecológicos importantes de los agaves en México; 8) el desarrollo biotecnológico de los agaves; 9) las actividades biológicas de los subproductos del agave y sus posibles aplicaciones en alimentos y farmacéuticos; y 10) los efectos sobre la salud de las fibras de agave (Santiago-Martínez *et al.*, 2023).

2.2 *Agave salmiana*

Agave salmiana crece en forma de rosetas densas y laxas, y puede medir entre 2 a 8 metros de altura, su diámetro alcanza los 2 a 5 metros de altura y puede tener de 30 a 70 hojas por individuo, éstas, son de un color verde opaco, verde claro o incluso verde amarillento, son dentadas, erectas y recurvadas; existen cuatro clasificaciones internas de *A. salmiana* Otto ex Salm: *A. salmiana* Otto ex Salm Dyck subsp *crassispina*, *A. salmiana* var. *Ferox*, *A. salmiana* Otto ex Salm Dyck var. *Angustifolia* y *A. salmiana* Otto ex Salm Dyck var. *Salmiana*. Entre los habitantes de México en los estados de Hidalgo y Tlaxcala, las especies de *A. salmiana* comúnmente reciben el nombre de maguey manso, maguey chalqueño, púa larga y ayoteco (Bethsua Mendoza Mendoza & Brianda Susana Velázquez de Lucio, 2023).

Esta planta puede adaptarse a condiciones climáticas adversas a través de diferentes adaptaciones fisiológicas y morfológicas, como hojas suculentas, un sistema radicular superficial (formación de cavidades) y una epidermis foliar gruesa con una alta acumulación de cera; además, el metabolismo del ácido crasuláceo (CAM) (Campos-Herrera *et al.*, 2025). Es considerada, una especie de uso tradicional, con morfotipos que van desde silvestres hasta cultivados, con una amplia historia cultural y de manejo. La especie es importante porque genera empleo, y sus productos se utilizan para el autoconsumo y se comercializan como materias primas. Es utilizada principalmente para la producción de pulque a partir de aguamiel (hidromiel), la cual presenta el mayor número de registros y variedades que forman parte de los sistemas agroforestales tradicionales de México (Sandoval-Zapotitla *et al.*, 2024).

El *Agave salmiana* Otto ex Salm, conocido como maguey, agave pulquero o árbol de las maravillas, es cultivado principalmente en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz. Se adapta a condiciones ambientales difíciles y a partir de él se puede producir una gran variedad de productos. Es una planta resistente a las sequías prolongadas características de los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Estado de México y Puebla donde la lluvia es reducida y son frecuentes las bajas temperaturas

en otoño e invierno (Bethsua Mendoza Mendoza & Brianda Susana Velázquez de Lucio, 2023).

Hidalgo es el estado con la mayor superficie cultivable de agave pulque en México, con una superficie aproximada de 4,905 hectáreas, que representa el 60% del cultivo en el país para el año 2019, Hidalgo es también el principal productor nacional de pulque, con una producción de 117,432,130 litros al año (68% de la producción nacional anual) (Figueredo-Urbina *et al.*, 2021). Los sistemas productivos del estado, están conformados por varias especies y subespecies, así como variedades tradicionales (plantas útiles que son reconocidas, nombradas, manejadas, propagadas y preservadas por los productores) de agave. En el caso de los agaves, las variedades tradicionales tienen las siguientes características: 1) tienen uno o más nombres comunes, a veces en el idioma nativo de la localidad, refiriéndose a características obvias de la planta o a su lugar de origen, 2) han sido manejadas por humanos a lo largo de dos o más generaciones, 3) son utilizadas por las comunidades rurales para múltiples propósitos, 4) pueden ser plantas cultivadas o silvestres manejadas *in situ*, 5) se encuentran en mayor medida en sistemas de producción tradicionales, aunque también se pueden encontrar en sistemas intensificados, 6) existe una gran riqueza de conocimientos y técnicas tradicionales asociadas al manejo y uso de cada variedad. Estas variedades tradicionales tienen importancia cultural y económica, además, forman parte de la identidad de los grupos culturales y satisfacen múltiples necesidades, especialmente las nutricionales, ya que los productos derivados se utilizan tanto para el autoconsumo como para la comercialización, generando ingresos monetarios para las familias (Figueredo-Urbina *et al.*, 2021).

El A. salmiana es una de las especies de agave más utilizadas para la producción de bebidas alcohólicas, donde se utiliza el tallo (el corazón o piña) mientras se desechan las hojas. Las hojas pueden alcanzar un peso de 7 a 10 kg, una longitud de 1,7 m y contener hasta 0,7 kg de jugo/kg de hoja (Hernández-Mendoza *et al.*, 2024). Luego de la etapa productiva del maguey, las hojas se convierten en residuos agroindustriales con alto contenido de celulosa (Lucila Márquez-Pallares *et al.*,

2024). Recientemente, en el contexto de la revalorización del patrimonio biológico y cultural, se han abierto oportunidades de desarrollo para la cadena productiva del agave (Blas-Yañez & Thomé-Ortiz, 2021), como la producción de bioetanol de segunda generación, como sustrato en la producción de hongos, para la producción de papel y nanopartículas de celulosa y plásticos biodegradables (Lucila Márquez-Pallares *et al.*, 2024). Adicionalmente, los residuos derivados de la elaboración de bebidas destiladas, incluyendo los tallos florales, el bagazo (residuos sólidos) y la vinaza (residuos líquidos) tienen diversos usos. Las hojas, extraídas del corazón de la roseta de agave, se utilizan comúnmente en la preparación de platos mexicanos, como en la barbacoa, donde las hojas se tuestan y se utilizan para envolver la carne con especias para cocinar, mientras que los residuos de bagazo y vinaza han demostrado ser una buena alternativa al compost. Estos residuos son subproductos ricos en polisacáridos que pueden utilizarse para la producción de fructanos, que pueden utilizarse en productos complementarios para tratar la diabetes o la obesidad. Las fibras de *agave* tienen una gran variedad de usos: como forraje alternativo y la producción de diferentes artesanías, o productos comunes como redes, cuerdas o textiles (Alducin-Martínez *et al.*, 2022).

En las zonas áridas y semiáridas del norte de México, donde la sequía es común, la disponibilidad de forraje es una de las restricciones más importantes para la producción animal. Pero los cactus, yucas y agaves no cultivados, son las plantas más comunes utilizadas como forraje para los rumiantes durante períodos de sequía. Por ejemplo, los tallos de *Agave salmiana* Otto Ex Salm-Dyck, son cocidos y fermentados para producir el mezcal, mientras que las partes superiores incluidas las hojas (alrededor de 400 g/kg de planta entera) y los subproductos, son utilizados como alimento para rumiantes. Debido a que la savia de la planta de agave contiene cristales de oxalato de calcio, aceites acres, saponinas y otros compuestos que inducen dermatitis irritante, solo se alimenta a los rumiantes con bajas cantidades de esta planta. Recientemente, se ha demostrado que el ensilado puede reducir los niveles de estos compuestos (Zamudio *et al.*, 2009), creando así, una solución efectiva a esta alternativa.

Al evaluar la composición química del ensilado, es posible comparar el forraje natural (**Tabla 1**) con el forraje conservado (**Tabla 2**) y observar la magnitud de las pérdidas que pudieran haberse producido durante este proceso (Macêdo *et al.*, 2019).

Tabla 1

Perfil fisicoquímico de las hojas de A. salmiana Otto ex Salm-Dyck previo al ensilado.

Parámetro	<i>A. salmiana</i>		
	(Pinos-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008)	(Zamudio <i>et al.</i> , 2009)	(Ruíz <i>et al.</i> , 2018)
pH	4.9	5	4.5
Materia seca (%)	13	22.2	28.37
Carbohidratos solubles (g/kg MS)	358	278	-
Saponinas (g/kg MS)	7.5	8.2	-
Azúcares reductores totales (%)	-	-	3.1

Nota. Perfil bromatológico de *A. salmiana* fresco.

Tabla 2

Perfil fisicoquímico de las hojas de A. salmiana Otto ex Salm-Dyck después de 4 semanas de ensilado.

Parámetro	<i>A. salmiana</i>		
	(Pinos-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008) ^{a*}	(Alcantar-Morales <i>et al.</i> , 2024) [*]	(Pinos-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008) ^{b*}

pH	3.58	-	3.7
Materia seca (%)	14.8	-	18.1
Carbohidratos solubles (g/kg MS)	-	-	-
Saponinas (g/kg MS)	5	-	-
Ácido láctico (g/kg MS)	138	83	-

Nota. Perfil bromatológico de *A. salmiana*.

*Estos valores son de ensilados con fermentación espontánea, sin la ayuda de cepas iniciadoras de la fermentación.

2.3 Ensilado

Con el aumento de la competitividad global en el sistema de carnes y lácteos, el uso de forrajes conservados está creciendo, cada año se promueven avances y equilibrio para la producción animal (Ramos *et al.*, 2021). La conservación de forrajes es un método que ofrece la oportunidad de conservar alimentos que pierden el mínimo de su valor nutricional, permitiendo que estos se almacenen y utilicen durante períodos más largos. Entre las formas de conservación de forrajes, el ensilado es el principal método utilizado en los sistemas de producción (Ramos *et al.*, 2021). El ensilado, es una práctica tradicional de conservación de forraje fresco para superar la variación entre la producción ganadera y la falta estacional de disponibilidad de forrajes, y desempeña un papel vital para ayudar al ganado a sobrevivir a los inviernos y las estaciones secas en muchos países del mundo (Tahir *et al.*, 2023).

La técnica se basa en el proceso de fermentación, donde la ausencia de oxígeno favorece la producción de ácido láctico, un producto resultante de la fermentación que aprovecha el material vegetal hasta convertirlo en material fermentado apto

para el consumo animal. Esta técnica constituye una estrategia viable para la alimentación de rumiantes, y resulta ventajoso por su simplicidad y eficiencia. Sin embargo, algo importante para tener en cuenta es que se debe tener cuidado con el valor nutricional de este alimento (Ramos *et al.*, 2021). Durante el proceso de ensilado convencional, las bacterias del ácido láctico (BAL) causan una rápida acidificación en condiciones anaeróbicas al convertir los carbohidratos solubles en agua (WSC, por sus siglas en inglés) en ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico (AL) mediante el cual se restringe el crecimiento de los microorganismos patógenos causantes de putrefacción (Tahir *et al.*, 2023).

El ensilado se ha considerado como la técnica más eficaz para preservar los nutrientes y las sustancias activas de las plantas, y proporcionar de una forma única alimento verde rico en nutrientes durante las temporadas de estiaje. Además, el ensilado se ha utilizado para reducir la concentración de factores antinutricionales, e incluso sustancias tóxicas o nocivas en la alimentación animal. Hasta la fecha, algunos investigadores se han centrado en los cambios en el valor nutricional y el contenido de sustancias activas después del ensilado, mientras que pocos han informado de la reducción de los factores anti nutricionales (Wang *et al.*, 2022).

La calidad del ensilaje se refiere directamente al éxito o fracaso del proceso de fermentación junto con el valor del contenido nutritivo del ensilaje, ya que es una variable que depende del proceso de conservación, así como de la composición de la planta forrajera inicial. La eficiencia de este proceso se debe a una menor pérdida de nutrientes, desde la cosecha hasta la alimentación (Ramos *et al.*, 2021).

Este es un proceso impulsado por microbios y una forma adecuada para la conservación de forrajes húmedos. La temperatura juega un papel crucial en la influencia del proceso de ensilado. En general, la temperatura de almacenamiento de 20 a 30 °C se considera adecuada para su fermentación (Jie Bai *et al.*, 2022). El proceso de hacer un buen ensilado incluye 1) la eliminación rápida del aire de la masa de forraje en el silo, 2) una rápida producción de ácido láctico que resulta en una caída rápida del pH, y 3) la exclusión continua del aire de la masa de ensilaje durante el almacenamiento y la alimentación (Kung *et al.*, 2018).

2.4 Fases del ensilado

El proceso de producción de ensilaje implica varios pasos, comenzando con el cultivo de forraje en el campo, la cosecha y el corte, el transporte y el embalaje, el sellado y la apertura, y la alimentación. Todos los pasos son igualmente importantes porque interfieren con el proceso de fermentación. Desde el punto de vista biotecnológico, el proceso de ensilado puede considerarse como una fermentación discontinua en la que el sustrato no es estéril, con amplias posibilidades de contaminación, y suele ser una fermentación natural (sin aditivos) con una alta escala de producción. En este proceso, es imposible intervenir después de que se establece la fermentación (cierre del silo). Esto hace que sea difícil de controlar en comparación con otras fermentaciones industriales, por lo que se debe tener cuidado al comienzo del proceso (Ávila & Carvalho, 2020).

Los investigadores dividieron el proceso de fermentación de los ensilados en diferentes fases (**Figura 1**), incluyendo la fase aeróbica inicial, la fase de fermentación, la fase estable y la fase de alimentación aeróbica (Soundharrajan *et al.*, 2021). No obstante, el proceso de fermentación del ensilado es un proceso dinámico en el que se produce una sucesión de diferentes grupos y especies de microorganismos de diferentes maneras. La mayoría de los microorganismos presentes en el ensilado obtienen energía a través de la fermentación, produciendo compuestos intermedios ricos en energía, con la excepción de los mohos y levaduras, así como las BAA (Bacterias del Ácido Acético), un grupo de bacterias Gram-negativas que oxidan azúcares o etanol y producen ácido acético durante la fermentación, y que realizan la respiración aeróbica (Ávila & Carvalho, 2020).

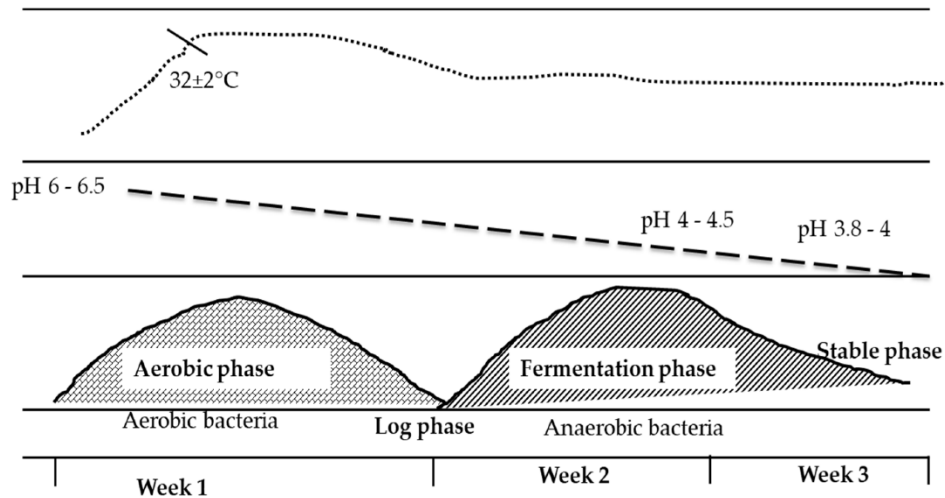


Figura 1: Fases del ensilado en materiales vegetales ensilados (Soundharrajan *et al.*, 2021).

Es muy importante que el momento y la duración del corte hasta el marchitamiento, esté planificado en tiempo y forma logística, esto con la finalidad de reducir al mínimo las pérdidas que puede tener el material vegetal, garantizando así la máxima calidad del ensilado (Ramos *et al.*, 2021).

2.4.1 Fase aeróbica

La fase aeróbica inicia en el momento en que el sustrato (forraje picado, granos de cereales molidos rehidratados o no, o incluso subproductos de la industria) se coloca dentro del silo (estructura diseñada para almacenar y conservar materiales vegetales a través del proceso de compactación, hasta que la concentración de oxígeno se reduce al máximo). Los materiales ensilados tienen un pH cercano a la neutralidad, y los sustratos para la fermentación, son principalmente azúcares que provienen del material original (Ávila & Carvalho, 2020).

El tiempo empleado en el sellado del silo, es un factor que aumenta las pérdidas de materia seca, ya que aumenta la actividad de las enterobacterias. La presencia de oxígeno en esta fase estimula los procesos químicos, donde se aprovecharán los nutrientes y la energía del forraje, además, potencia la producción de agua

(aumentando la humedad), dióxido de carbono, amoníaco libre y el aumento de la temperatura (Ramos *et al.*, 2021).

En esta fase, es muy notable el aumento de la temperatura del ensilado (> 32°) debido a la respiración celular de las plantas y los microbios aeróbicos, que permanecen activas después del corte. En esta condición, la cantidad de energía generada por la respiración es mucho mayor y esta energía se puede disipar en forma de calor. Con el aumento de la acidificación y las concentraciones de oxígeno, los microorganismos que no pueden sobrevivir en estas condiciones se inhiben o entran en etapas de latencia. En esta etapa están presentes microorganismos epífitos de las plantas, posibles contaminantes o inóculos añadidos manualmente. Los microorganismos epífitos más comunes son las enterobacterias, las levaduras, los mohos y el bajo número de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) su diversidad es variable entre las plantas, los climas y el manejo de los cultivos forrajeros (Soundharrajan *et al.*, 2021). La cantidad de energía generada por la respiración aeróbica es mucho mayor que la de la fermentación. Con la reducción del pH y las concentraciones de oxígeno, los microorganismos que no pueden tolerar estas condiciones se inhiben, mientras que los que sí pueden, prevalecen (Ávila & Carvalho, 2020).

La proteólisis (proceso de degradación de proteínas) puede comenzar en la etapa aeróbica y ocurre por la acción de una variedad de enzimas proteolíticas vegetales o microbianas y muchas pueden permanecer activas durante la fermentación. La viabilidad de las enzimas presentes en condiciones de ensilaje puede variar, especialmente con condiciones variables de pH y temperatura, y depende de la enzima producida. Los microorganismos proteolíticos más importantes en el ensilado son las enterobacterias y el *Clostridium*; las primeras son más frecuentes al inicio de la fermentación, y es posible que estas enzimas también permanezcan viables durante largos períodos de almacenamiento (Ávila & Carvalho, 2020).

Algo a considerar, es que los forrajes muy húmedos pueden presentar un mayor período en la fase aeróbica, donde la acción de microorganismos indeseables reduce la capacidad de las bacterias ácido lácticas de dominar el material ensilado

y en consecuencia, mientras más tarde en disminuir el pH, mayores serán las pérdidas de nutrientes y energía (Macêdo *et al.*, 2019).

Seguido de esto, la compactación juega un papel importante para dar inicio a la fase de fermentación, esta debe ser eficiente en la remoción del oxígeno en la masa ensilada, y deberá proporcionar un ambiente anaeróbico en el silo para reducir las pérdidas ocasionadas por un rendimiento inadecuado (Ramos *et al.*, 2021).

Esta fase suele durar un día, pero puede llevar más o menos tiempo, dependiendo de las prácticas de ensilado. Los silos bien empaquetados y sellados generalmente tendrán una fase aeróbica más corta (tan solo unas pocas horas), mientras que los silos mal empaquetados y sellados tendrán una fase aeróbica más larga. Las fases aeróbicas largas pueden ser perjudiciales para la calidad final del forraje. Las fases aeróbicas largas dan como resultado temperaturas de ensilaje muy altas (más de 37° C), altas pérdidas de materia seca (debido al aumento de nutrientes necesarios para alimentar esta fase), crecimiento de moho, producción de micotoxinas y reacciones de Maillard (pardeamiento del forraje, que convierten la proteína digerible en proteína unida e indigerible) (Pretz, 2020).

Una vez que se agota el oxígeno restante, las células vegetales se descomponen y las bacterias las utilizan como fuente de alimento. Las enzimas vegetales descomponen los carbohidratos complejos, el almidón y la fibra en azúcares más simples que son fácilmente utilizados por las bacterias. Las enzimas también descomponen las proteínas vegetales en este momento, lo que hace que las proteínas sean más solubles. Las bacterias utilizarán los jugos celulares producidos durante la fase de retraso (tiempo que transcurre desde el llenado del silo hasta el sellado) para crecer durante la fase de fermentación (Pretz, 2020).

2.4.2 Fase de fermentación

Esta fase comienza de 2 a 3 días después del ensilado. Cuando los jugos celulares están disponibles, se ha eliminado el oxígeno y el pH del ensilado ha disminuido a un nivel en el que las bacterias del ácido láctico pueden crecer (es decir, por debajo

de 5,7 pH) (Pretz, 2020). Las bacterias del ácido láctico comienzan a crecer, multiplicarse, producir ácido láctico y algo de ácido acético, y aumentan aún más la acidez del ensilado (Pretz, 2020). La fermentación por parte de los microorganismos dominantes se vuelve más intensa. En un ensilado bien compactado con suficientes carbohidratos solubles, las BAL dominan el proceso debido a sus características adaptativas, lo que da como resultado un material bien conservado. La población y la diversidad epífita de las BAL también son muy variables, lo que interfiere en el proceso. Si las BAL dominan el proceso, la principal fermentación que se produce es la fermentación con ácido láctico; sin embargo, puede haber una gran proporción de fermentación homo o heterofermentativa, lo que puede dar lugar a variaciones en la proporción de ácido láctico a ácido acético de 1:1 a 6:1 (Ávila & Carvalho, 2020).

Los grupos microbianos que actúan sobre el material ensilado, tienen la capacidad de producir diferentes tipos de ácidos según su capacidad para fermentar azúcares simples para su desarrollo. Cada grupo microbiano posee una vía de fermentación específica según el sustrato que utiliza, y cada vía puede ser más o menos eficiente en términos cuantitativos y cualitativos, lo que resulta en mayores o menores pérdidas de materia seca y energía. Los principales carbohidratos solubles utilizados son: glucosa, fructosa, sacarosa, arabinosa y fructosanos; y los subproductos de la fermentación de estos azúcares pueden ser lactato, acetato, etanol, butirato y CO₂ (Macêdo *et al.*, 2019).

Si la producción de ácido láctico no es suficiente para bajar el pH a valores que inhiban: enterobacterias, *Clostridium spp.*, *Listeria spp.*, y Bacterias del Ácido Propiónico (BAP), estas pueden seguir creciendo, realizando otras fermentaciones y produciendo los diversos productos de su metabolismo. En algunos forrajes o sustratos, generalmente aquellos con altas concentraciones de azúcar, puede haber un crecimiento intenso de levaduras y, por lo tanto, una alta producción de etanol en esta etapa. Esto demuestra que, en estos casos, la producción de etanol puede ser más intensa que la de ácido láctico. Por otra parte, a menos que ocurra un aporte de oxígeno, el crecimiento de mohos en la fase de fermentación será generalmente

bajo, prevaleciendo solo unos pocos géneros y especies más adaptadas (Ávila & Carvalho, 2020).

Las concentraciones de ácidos orgánicos que se producen en el ensilado expresan el tipo de fermentación que tuvo lugar durante el proceso. Por lo tanto, la producción de ácidos influye en la disminución del pH. Entre estos ácidos, destaca el ácido láctico, ya que se produce en mayor cantidad que otros ácidos y, al tener una constante de disociación más alta, posee una mayor capacidad acidificante. (Macêdo *et al.*, 2019).

La duración de esta fase, o la intensidad de la fermentación, depende en gran medida de dos factores, el sustrato disponible y las condiciones de crecimiento de los microorganismos dominantes (pH y anaerobiosis). Los sustratos más importantes son los carbohidratos solubles en agua, ya que la mayoría de las BAL no son capaces de degradar los carbohidratos complejos. Lo mismo ocurre con las otras bacterias presentes en el ensilado que compiten con las BAL por estos sustratos. El almidón y los hidratos de carbono de la pared celular no son utilizados por la mayoría de los microorganismos presentes en el ensilado, a excepción de los mohos. Estos hidratos de carbono, sin embargo, pueden hidrolizarse liberando azúcares simples, lo que explica la caída del pH en el ensilado en el que el sustrato principal es el almidón. La actividad proteolítica también puede estar presente en esta etapa y se ha asociado con *Clostridium* spp., en función del entorno anaeróbico, pero las enzimas de otros microorganismos o incluso las enzimas proteolíticas de las plantas pueden seguir siendo viables (Ávila & Carvalho, 2020).

Así, dependiendo del rango de pH, pueden existir cambios cualitativos en la microbiota epífita del ensilaje durante la fermentación, un pH en el rango de 6,0 permite el desarrollo de clostridios y enterobacterias, un pH en el rango de 5,0 permite el desarrollo de bacterias ácido lácticas heterofermentativas, un pH en el rango de 4,0 proporciona un ambiente ideal para el desarrollo de bacterias ácido lácticas homofermentativas y valores de pH inferiores a 3,5 proporcionan un ambiente adecuado para el desarrollo de levaduras (Macêdo *et al.*, 2019).

La cantidad de materia seca pérdida durante la fermentación depende principalmente de las especies microbianas dominantes en el ambiente y los sustratos fermentados. Las principales pérdidas se deben a la actividad de enterobacterias, clostridios y levaduras, destacan las bacterias ácido lácticas heterofermentativas, que fermentan glucosa y producen dióxido de carbono, lo que reduce la materia seca y el contenido energético bruto del ensilado. La temperatura dentro del silo influye en el crecimiento de los microorganismos, las BAL crecen entre 27 y 38 °C (Ramos *et al.*, 2021).

El ácido láctico es más fuerte que el ácido acético y, por lo tanto, disminuye el pH del ensilado más que el ácido acético. Hay dos tipos de bacterias lácticas: homofermentativas y heterofermentativas. Las bacterias homofermentativas producen principalmente ácido láctico, mientras que las bacterias heterofermentativas producen ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono (Pretz, 2020). Las bacterias homofermentativas son más deseables ya que trabajan más rápido, ahorrando más nutrientes para que la vaca los use y para que el ensilado se conserve mejor. Del ácido total en el ensilado bien conservado, al menos el 70% debe ser ácido láctico. La cantidad inicial de bacterias del ácido láctico en el ensilado será mayor con temperaturas más cálidas y mayor humedad del ensilado. La fase de fermentación anaeróbica suele durar unas dos semanas y el ensilado se enfría hasta casi la temperatura ambiente (Pretz, 2020).

2.4.3 Fase estable

Durante la fase de fermentación, las condiciones de crecimiento se vuelven inadecuadas para la mayoría de los microorganismos, y el material ensilado entra en una etapa de estabilidad. En un proceso fermentativo, se define la estabilidad como el momento en el que no se producen cambios o se producen cambios mínimos (Ávila & Carvalho, 2020). Así, si ningún factor modifica las condiciones del entorno, este ensilado se mantendrá estable. Los microorganismos que permanecen viables en esta etapa son tolerantes a estas condiciones,

generalmente algunas BAL, algunas levaduras, esporas bacterianas (*Clostridium* y bacterias formadoras de esporas aeróbicas) y algunas esporas de moho. La duración de esta fase dependerá del mantenimiento de esta condición, que en este caso significa que no hay entrada de oxígeno en el silo. Al igual que en la fase de fermentación, a medida que avanza la fase de estabilidad, se producen algunas reacciones, como la descomposición de los carbohidratos complejos y la proteólisis. Esto puede ser ventajoso en el primer caso al liberar lentamente carbohidratos solubles en agua a las BAL y, en el segundo caso, al descomponer la matriz proteica en el material vegetal y aumentar la digestibilidad del almidón (Ávila & Carvalho, 2020).

Aunque las reacciones durante la fase estable son mínimas, el tiempo de almacenamiento afecta a las características fermentativas de un ensilado, como la población microbiana y los productos de fermentación. Borreani *et al.*, (2014) observaron que el tiempo de almacenamiento afectaba el pH, los ácidos láctico, acético y propiónico, el 1,2-propanodiol, la relación ácido láctico/acético y el NH₃-N. Estos autores observaron que el ensilado conservado durante 110 días mostró concentraciones de ácido láctico y relaciones láctico/ácido acético más bajas, y concentraciones de pH, ácido acético y 1,2 propanodiol más altas que el ensilado conservado durante 55 días.

Si los azúcares disponibles se agotan antes de que el ensilado alcance un pH bajo, la fermentación se detendrá antes de que el ensilado alcance la fase estabilizada, lo que aumenta el potencial de un perfil de fermentación deficiente, una menor palatabilidad y menos nutrientes disponibles para la vaca (Pretz, 2020).

2.4.4 Fase de alimentación

Cuando el silo se abre para la alimentación, la masa ensilada entra en contacto con el oxígeno, lo que modifica uno de los principios de conservación, la anaerobiosis, alterando las condiciones ambientales. En esta etapa, los microorganismos que han sobrevivido en forma activa o en forma de esporas cuyo crecimiento está limitado solo por la disponibilidad de oxígeno vuelven a crecer. Las levaduras generalmente

inician el proceso porque son anaerobias facultativas, y muchas son tolerantes a la acidez. Las levaduras que asimilan lactato (*Saccharomyces*, *Candida* y *Pichia*) son generalmente los principales iniciadores del deterioro aeróbico del ensilado (Ávila & Carvalho, 2020).

Las levaduras y las bacterias del ácido acético pueden utilizar productos de fermentación, provocando un aumento del pH y, por tanto, favoreciendo el crecimiento de otros microorganismos aeróbicos deteriorantes en el ensilado. Los mohos son generalmente menos tolerantes a los ácidos que las levaduras, por lo que su crecimiento normalmente se observa después del crecimiento de la levadura. Estos microorganismos sobreviven en forma de esporas y el tiempo necesario para la multiplicación es mayor. El crecimiento de microorganismos, principalmente los que realizan la respiración aeróbica como mohos y levaduras, provoca un calentamiento masivo. La temperatura se utiliza normalmente como una medida indirecta del deterioro aeróbico. La técnica más comúnmente utilizada define la estabilidad aeróbica como el tiempo que transcurre antes de que el ensilado muestre una clara evidencia de calentamiento, es decir, cuando la temperatura del ensilado excede la temperatura ambiente en 2 °C. Sin embargo, se puede evaluar cualquier modificación en las características químicas o microbiológicas de los ensilados (Ávila & Carvalho, 2020).

Varios factores afectan el grado y la rapidez con la que se produce el deterioro aeróbico. Entre estos, la población de levaduras u otros microorganismos aeróbicos, la concentración de oxígeno, los metabolitos producidos durante el ensilado, el pH, los carbohidratos restantes, las condiciones de temperatura y humedad, y la capacidad de amortiguación son los más importantes. Los factores que afectan el grado de deterioro aeróbico actúan conjuntamente en un proceso complejo en el que las interacciones entre la diversidad significativa de microorganismos pueden causar muchas variaciones (Ávila & Carvalho, 2020).

Perfil del ensilado

Para identificar si el ensilado tuvo una fermentación adecuada, es de buena calidad y apto para consumo, es necesario evaluar su perfil y calidad mediante parámetros microbiológicos y fisicoquímicos, principalmente. Para verificar la eficacia del proceso de ensilado, se pueden realizar evaluaciones basadas en algunos parámetros como el pH, los ácidos orgánicos y el nitrógeno amoniacal (Ramos *et al.*, 2021).

2.5 Perfil microbiológico

En la fermentación del ensilado el sustrato no se esteriliza, por lo que el microbiota que inicia la fermentación está compuesta por la microbiota natural de la planta forrajera, contaminantes y/o inoculantes que se pueden añadir. Durante la fermentación, la microbiota se altera en función de las características del cultivo forrajero y de las técnicas de ensilado utilizadas, con una sucesión de géneros y especies, en la medida en que cambian las condiciones del entorno. El conocimiento sobre el metabolismo de las bacterias ácido lácticas se utiliza para explicar la forma en que estos microorganismos actúan durante la fermentación. (Ávila & Carvalho, 2020).

2.5.1 Bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un tipo de bacterias grampositivas con un contenido inferior al 55% mol de G+C, que utilizan los carbohidratos como única o principal fuente de carbono, son generalmente cocos o bastones y algunos pueden formar tétradas, las BAL tienen una fuerte tolerancia al pH bajo (≤ 3). Estas bacterias carecen de citocromos y no pueden sintetizar porfirinas. Sin embargo, sus características pueden variar bajo ciertas condiciones, una BAL cultivada en condiciones estándar, es aerotolerante, organotrófica (obtiene su energía y carbono

de compuestos orgánicos), además que es estrictamente fermentativa y produce ácido láctico como único o principal producto final. Las células suelen ser inmóviles y necesitan factores de crecimiento complejos como vitaminas y aminoácidos (Wang *et al.*, 2021).

Muchas BAL requieren nutrientes complejos y temperaturas de fermentación ligeramente bajas (< 45 °C) a comparación de otros microorganismos, lo que conlleva mayores costos y riesgo de contaminación. Además, son de baja productividad debido a la producción de amilasa en el paso inicial, causando una larga fase de retraso (Abedi & Hashemi, 2020).

Las BAL cubren una variada gama de géneros que incluyen especies de *Lactobacilos*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostocs*, *Carnobacterium* y *Weissella*. Por lo tanto, las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo muy heterogéneo (George *et al.*, 2018) y es posible encontrarlas en múltiples escenarios ecosistémicos. De estos, el género *Lactobacillus* resulta más notable gracias a su alta capacidad de fermentación (Stephen & Saleh, 2023). Las bacterias ácido lácticas inhiben a sus competidores al combinar la rápida utilización de abundantes carbohidratos con la acumulación de ácido láctico y acético (Michael G. Gänzle & Gänzle, 2015).

Fisiológicamente, las BAL se pueden dividir en dos grandes grupos: homofermentativo y heterofermentativo, en función de sus vías de fermentación de la hexosa. Las bacterias ácido lácticas homofermentativas convierten las hexosas en ácido láctico principalmente a través del proceso de glucólisis, con la enzima aldolasa que permite una conversión casi completa de la glucosa; también, pueden utilizar carbohidratos hexosa y pentosa a través de la vía Embden-Meyerhof (**Figura 2**). El subproducto primario de las BAL homofermentativas son dos moléculas de ácido láctico por mol de glucosa ingerida; sin embargo, los rendimientos experimentales varían según el tipo de fuente de carbono utilizada (Wang *et al.*, 2021). Las BAL heterofermentativas utilizan la vía de las pentosas-fosfato y producen ácido láctico, junto con otros subproductos como el dióxido de carbono, el ácido acético y el etanol (Stephen & Saleh, 2023). Esta vía tiene varios

subproductos, por cada mol de glucosa que se descompone, se genera 1 mol de lactato, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂, es decir, producen varios productos finales (**Figura 3**) (Wang *et al.*, 2021).

Las BAL homofermentativas incluyen algunas especies de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y algunos *Lactobacillus*. Pero, existen otras BAL que pueden metabolizar la glucosa en ácido láctico, ácido acético (AA), etanol, diacetilo, acetoína y dióxido de carbono (la detección de gas CO₂ es una prueba diagnóstica para la fermentación heterofermentativa de la homofermentativa). Las BAL heterofermentativas pueden utilizar la vía del fosfogluconato (con un rendimiento teórico de 0,5 g/g) y la vía de la fosfocetolasa (con un rendimiento teórico de 0,6 g/g), al metabolizar los azúcares hexosa y pentosa, respectivamente (Abedi & Hashemi, 2020).

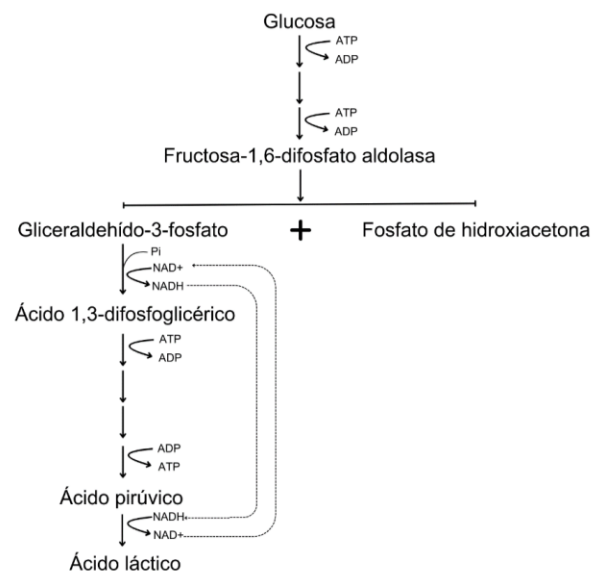


Figura 2: Ruta metabólica del proceso de fermentación homoláctica. Traducción del original en inglés de Wang *et al.* (2021). Las bacterias del ácido láctico utilizan glucosa como fuente de carbono para producir piruvato a través de la glucólisis y luego producen ácido láctico bajo la acción de la enzima lactato deshidrogenasa. En teoría, 1 mol de glucosa produce 2 moles de ácido láctico.

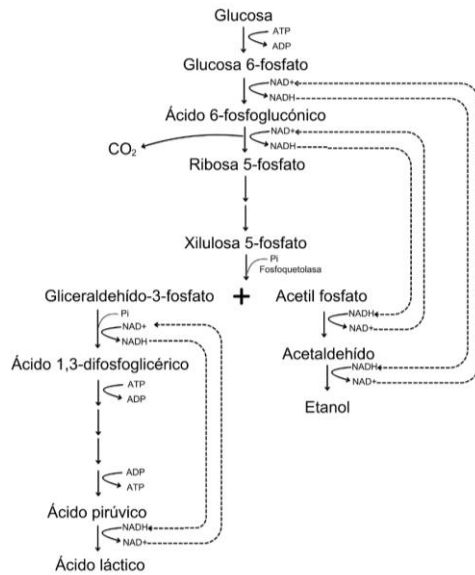


Figura 3: Ruta metabólica del proceso de fermentación heteroláctica. Traducción del original en inglés de Wang *et al.* (2021). En las bacterias lácticas de este tipo de fermentación, la glucosa se puede descomponer en ácido láctico, etanol y CO₂, en relación 1:1:1, a través de la vía de la fosfoacetolasa. En teoría, 1 mol de glucosa produce 1 mol de ácido láctico.

2.5.2 Producción y degradación de compuestos

La capacidad de las bacterias ácido lácticas para producir ácidos orgánicos y otras sustancias antimicrobianas los han hecho esenciales en la conservación de los alimentos de origen vegetal, mientras que también son los microorganismos más importantes que promueven cambios positivos significativos en el producto fermentado. Su metabolismo a lo largo de la fermentación contribuye a disminuir algunos factores tóxicos y anti nutricionales y a promover compuestos bioactivos biodisponibles (George *et al.*, 2018).

Como cepa de fermentación, las bacterias del ácido láctico deben tener varias características metabólicas importantes, como la capacidad de producir ácido y aroma, la capacidad de hidrolizar proteínas, la capacidad de producir exopolisacáridos viscosos y la capacidad de inhibir las bacterias (Wang *et al.*, 2021).

2.5.1.1 Degradación de macromoléculas

Durante el proceso de fermentación, la degradación de macromoléculas por parte de las bacterias ácido lácticas puede mejorar la calidad del producto, dentro de las más importantes se encuentra la degradación de polisacáridos no digeribles, proteínas, aminoácidos, sustancias no nutritivas y nocivas.

En el caso de la degradación de polisacáridos, es posible que las bacterias ácido lácticas puedan producir monosacáridos o ácido láctico, etc. Mientras que, en la degradación de proteínas de tipo macromolecular, las BAL son capaces de eliminar alérgenos proteicos de los alimentos y mejorar la digestibilidad de proteínas y aumentar su valor nutricional, este proceso está íntimamente relacionado con la calidad de los productos fermentados. Por otro lado, se encuentra la degradación de aminoácidos, y en este, las bacterias ácido lácticas son capaces de metabolizar los aminoácidos del sustrato y producir sustancias aromatizantes, y también metabolizar sustancias indeseables como las aminas biógenas (BA), estas pueden ser beneficiosas para la supervivencia de las bacterias ácido lácticas y disminuyen a medida que las BAL dominan el proceso, este metabolismo de los aminoácidos es de gran importancia para que las bacterias se adapten al medio donde viven. Las bacterias del ácido láctico son capaces de inhibir la acumulación de micotoxinas en la fermentación de cereales, descomponer sustancias nocivas en la fermentación del alcohol, y de igual manera, descomponer el ácido fítico en la fermentación, esto reduce los posibles sabores indeseables en los alimentos fermentados (Wang *et al.*, 2021).

Aunque las bacterias del ácido láctico han mostrado una variedad de efectos de degradación, aún no son consideradas como microorganismos con una fuerte capacidad de degradación, ya que tiene limitaciones en cuanto a eficiencia, eficacia y condiciones ambientales (Wang *et al.*, 2021). La principal razón de degradación de este tipo de compuestos es para adaptarse al medio donde habitan y esta acción actúa a su favor en su supervivencia.

2.5.1.2 Productos sintetizados

El principal producto metabólico de las BAL es el ácido láctico, este es un ácido orgánico de tres carbonos. Se conoce químicamente como ácido 2-hidroxiopropanoico y posee una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas desde la conservación de productos alimenticios humanos y animales (Stephen & Saleh, 2023) hasta la agricultura, la medicina, la industria química y la protección del medio ambiente. (Wang *et al.*, 2021).

En una fermentación homoláctica, producirá principalmente el ácido láctico, pero, en la fermentación heteroláctica sintetizará otros ácidos orgánicos además del ácido láctico, ya que además de descomponerse en ácido láctico, el ácido pirúvico se puede descomponer en ácido acético, ácido fórmico y etanol bajo ciertas condiciones, o descomponerse en ácido acético y dióxido de carbono. Algunos de estos ácidos se producen en el metabolismo de los aminoácidos (Wang *et al.*, 2021).

Además del ácido láctico, las BAL pueden sintetizar una gran variedad de vitaminas, como el ácido fólico, la riboflavina, la vitamina C, el piridoxal, la cobalamina, entre otras. En la industria alimentaria, las vitaminas sintetizadas durante la fermentación de las bacterias del ácido láctico se consideran como una fortificación nutricional de los alimentos. Esta fortificación nutricional amplía la aplicación de bacterias ácido lácticas para formular alimentos fermentados ricos en ciertas vitaminas según la población a la que va dirigido, en algunos casos es necesaria la adición de compuestos para maximizar la producción de estas vitaminas (Wang *et al.*, 2021).

Las bacterias del ácido láctico actúan como bacterias dominantes o trabajan en conjunto con otras bacterias dominantes para producir acetaldehído, diacetilo y otras sustancias aromatizantes a través de la biosíntesis y la acción enzimática, las cuales incluyen ácidos orgánicos, alcoholes, cetonas y ésteres. El metabolismo del ácido cítrico produce compuesto de sabor, mientras que el de los aminoácidos produce sustancias aromatizantes. Las BAL dentro de su metabolismo también son capaces de sintetizar sustancias antioxidantes que son altamente seguras y que tienen una variedad de efectos beneficiosos a través de los alimentos, estas

sustancias son de gran importancia ya que tienen una excelente capacidad para eliminar los radicales libres y están estrechamente relacionadas con la salud del consumidor (Wang *et al.*, 2021).

Las BAL también sintetizan bacteriocinas, que son secretadas fuera de la célula y ayudan a realizar la función de probióticos en el intestino del consumidor (Wang *et al.*, 2021). Las BAL pueden utilizar el sistema proteico autoinmune para protegerse de la bacteriocina que producen, mientras que, con ella, inhiben a otros microorganismos que viven en el mismo medio (Cheng 2023). Actualmente su valor crece y son usados como los metabolitos primarios más prometedores para el desarrollo de los antibióticos (Śliżewska & Chlebicz-Wójcik, 2020).

Otro subproducto de importancia biológica que las BAL son capaces de sintetizar, son los exopolisacáridos, estos son sustancias macromoleculares producidas por la polimerización de múltiples monosacáridos o sus derivados y contienen excelentes propiedades físicas y funciones probióticas (Wang *et al.*, 2021). En el contexto vegetal, los exopolisacáridos (EPS) desempeñan un papel crucial en la fisiología de las plantas, este genera un efecto resistente y puede garantizar el crecimiento de las plantas bajo estrés por sequía, tienen efectos antioxidantes, antibacterianos, inmunomoduladores e incluso antivirales, todo esto contribuye al crecimiento de las plantas (Cheng, 2023).

2.5.1.3 Clasificación y tipos de BAL

Las bacterias ácido lácticas corresponden más estrictamente a los miembros del orden *Lactobacillales* desde un punto de vista taxonómico (Wang *et al.*, 2021). Estas se adaptan a diversas condiciones y cambian su metabolismo en consecuencia; cubren una variada gama de géneros que incluyen más de 60, los más frecuentes en la fermentación de alimentos generalmente incluyen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, etcétera (George *et al.*, 2018).

Para fines de la investigación, se aborda el género *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* fue propuesto por Beijerinck en 1901 e incluye microorganismos gran-positivos, fermentativos, anaeróbicos facultativos o anaerobios estrictos y no formadores de esporas. El género se clasifica en el filo Bacillota, clase Bacilos, orden Lactobacillales, familia Lactobacillaceae, que contiene los géneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, y *Pediococcus*. Las células del género *Lactobacillus* tienen forma de coco o bastón y pueden formar cadenas. El principal producto del metabolismo fermentativo es el lactato, y otros productos pueden ser acetato, etanol, CO₂, formiato o succinato. Tienen requerimientos nutricionales complejos de aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables (Zheng *et al.*, 2020). A partir de marzo de 2020, Zheng *et al.* reclasificaron las 261 especies de Lactobacillaceae en 25 géneros (incluidos 23 géneros nuevos) debido a su alta diversidad genotípica y fenotípica.

Los lactobacilos metabolizan los carbohidratos para producir ácido láctico, lo que los convierte en el género más grande dentro del grupo de las bacterias del ácido láctico (Śliżewska & Chlebicz-Wójcik, 2020). Del mismo modo, son capaces de fermentar un espectro amplio de carbohidratos para fermentar fructanos extracelulares, almidón o glucógeno, gracias a la capacidad específica de cada cepa (Zheng *et al.*, 2020).

Entre las cepas de BAL, las de *Lactobacillus* tienen gran importancia comercial debido a su alta tolerancia al ácido, alto rendimiento y productividad, y pueden diseñarse para la producción selectiva de ácido L/D-láctico (Abedi & Hashemi, 2020). La administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (USFDA) ha reconocido al género *Lactobacillus* con el estatus de “Generalmente Seguro” (GRAS) y el estatus de “Presunción de Seguridad Calificada” (QPS) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Śliżewska & Chlebicz-Wójcik, 2020).

Metabolismo y rutas metabólicas

Tradicionalmente, las especies de *Lactobacillus* pueden dividirse en tres grupos en función de su metabolismo. El grupo homofermentativo obligado que fermenta carbohidratos para producir ácido láctico como subproducto principal, el grupo heterofermentativo facultativo que, bajo ciertas condiciones o con ciertos sustratos, fermenta carbohidratos para producir ácido láctico, etanol/ácido acético y dióxido de carbono como subproductos y el grupo obligatoriamente heterofermentativo que siempre fermenta carbohidratos para producir ácido láctico, etanol/ácido acético y dióxido de carbono como subproductos. (Śliżewska & Chlebicz-Wójcik, 2020), sin embargo, las consideraciones fisiológicas y filogenéticas, así como los análisis genómicos, reemplazan esta diferenciación por una más simple de bacterias lácticas homofermentativas y bacterias lácticas heterofermentativas (Zheng *et al.*, 2020).

Las bacterias heterofermentativas se diferencian de los homofermentativas por poseer fosfocetolasa. Esta enzima permite a las BAL heterofermentativas fermentar pentosas, produciendo principalmente ácidos láctico y acético (Muck *et al.*, 2018).

La familia de las Lactobacillaceae son la única familia dentro de las Lactobacillales que incluye microorganismos homofermentativos y heterofermentativos. Dentro del género *Lactobacillus*, los lactobacilos homofermentativos y heterofermentativos forman clados filogenéticos distintos, mientras que el metabolismo homoláctico o heteroláctico se conserva en otras bacterias lácticas a nivel familiar. El metabolismo de las pentosas, sin embargo, es variable a nivel de especie o cepa. Las bacterias lácticas homofermentativas metabolizan hexosas a través de la vía de Embden-Meyerhoff para piruvato como intermediario metabólico clave; mientras que, las bacterias lácticas heterofermentativas metabolizan hexosas a través de la vía de la fosfocetolasa al piruvato y al acetil-fosfato como intermediarios clave (Zheng *et al.*, 2020).

Lacticaseibacillus pantheris

Una gran mayoría de bacterias ácido lácticas han sido aisladas de múltiples procesos de fermentación, por ello es que se explota su capacidad de cepa fermentadora en el mismo entorno. Dentro del grupo de trabajo se aislaron cepas de BAL en ensilados finales de *A. salmiana*, una de estas se identificó taxonómicamente como *Lactobacillus pantheris* (Mosqueda-Hernández, C. 2023).

Lacticaseibacillus pantheris, anteriormente conocido como *Lactobacillus pantheris*, fue nombrado debido a su aislamiento de las heces de un jaguar en el zoológico de Pekín, China, de acuerdo con Liu y Dong (2002).

L. pantheris es una bacteria gram-positiva, en forma de bacilo, no formadora de esporas, tiene una temperatura óptima de crecimiento de 22-41°C, es anaerobia y en algunos casos suele ser microaerófila, no es termófila ni flagelada. La cepa se ha aislado en gran parte del mundo en muestras acuáticas, de suelo, de animales y plantas con una cantidad de 357, 223, 3341 y 230 respectivamente. En el centro de la República Mexicana, el aislamiento de la cepa ha recibido mayor atención. Su nivel de seguridad es 1, ya que no representa un riesgo para la salud humana en la manipulación de este microorganismo (Reimer *et al.*, 2022).

Esta bacteria tiene un genoma con un tamaño de 2,55 Mbp y un contenido de G+C en su ADN de 52,9%, esto podría sugerir que la bacteria tiene una estructura genética relativamente estable y que podría estar bien adaptada a condiciones ambientales que requieren mayor estabilidad del ADN, como temperaturas altas o condiciones extremas. La cepa tipo se identifica como A24-2-1^T, con varios números de registro: DSM 15945^T, COMO 1,2826^T, JCM 12539^T y LMG 21017^T, según Zheng *et al.* (2020).

Si bien, la información de la aplicación de *L. pantheris* es aún un tanto desconocida, el interés y exploración en esta cepa de fermentación se encuentra en auge. En su trabajo reciente de 2022, Shouxin Sheng *et al.* exploran el potencial de *Lactobacillus pantheris* como probiótico y en la producción de exopolisacáridos con actividades

inmunomejoradas y anticancerígenas; abriendo un panorama muy amplio para futuras investigaciones de esta especie bacteriana.

Lactiplantibacillus plantarum

Lactiplantibacillus plantarum (*L. plantarum*) es un tipo de lactobacilo que se encuentra comúnmente en una variedad de entornos, incluidos productos lácteos, ensilaje, chucrut, verduras en escabeche, masa madre, estiércol de vaca, la boca humana, el tracto intestinal y las heces, así como en aguas residuales. Este microorganismo, que deriva su nombre del latín "plantarum", indica su asociación con plantas (Bringel *et al.*, 2005).

L. plantarum es una bacteria gram-positiva, en forma de bacilo, no tiene motilidad y su temperatura de crecimiento se encuentra en el rango 15-37°C, pero su temperatura óptima más aceptable es de 30-37°C. Se considera anaerobio facultativo y no es formadora de esporas ni flagelado. La cepa se ha aislado de diversas fuentes, como lo son muestras acuáticas, de suelo, de animales y de plantas. Su clasificación de bioseguridad es nivel 1, así que no representa un riesgo en su manipulación (Reimer *et al.*, 2022).

Tiene un tamaño de genoma de 3,45 Mbp y un contenido de G+C del ADN de 44,2%, esto podría indicar que la bacteria está adaptada a condiciones ambientales más variadas y no necesariamente extremas. Originalmente es nombrado como *Lactobacillus plantarum*, este basónimo subraya la importancia histórica y taxonómica de la especie dentro de los estudios microbiológicos (Zheng *et al.*, 2020).

Reduce rápidamente el pH, inhibe el crecimiento microbiano patógeno y preserva las proteínas vegetales. Esto se debe a la robustez y las propiedades probióticas únicas de *L. plantarum*, incluida la alta tolerancia a ambientes ácidos y biliares y la actividad antagónica (Okoye *et al.*, 2023).

Género *Pediococcus*

Los *Pediococcus* tienen una morfología de coco y forman tétradas específicas, muy distintivas. Son bacterias ácido lácticas grampositivas, no productoras de catalasa, anaerobias facultativas, homofermentativas, inmóviles y no esporulantes que pertenecen a la familia Lactobacillaceae en el orden Lactobacillales (Todorov *et al.*, 2022).

Pediococcus spp. puede fermentar carbohidratos en función de los patrones de asimilación específicos de la especie. La glucosa siempre se fermenta a través de la vía homofermentativa y se asocia a la producción de DL-Lactato racémico a través de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). En general, los representantes de *Pediococcus* spp. pueden describirse como quimiorganotrofos (utilizan sustancias orgánicas como carbohidratos, aminoácidos o ácidos grasos para producir energía). La mayoría de los *Pediococcus* requieren de la presencia de aminoácidos y vitaminas B en el medio para su crecimiento. En general, *Pediococcus* spp. puede fermentar glucosa, fructosa, galactosa, manosa, celobiosa, arabinosa, ribosa, salicina, amigdalina, esculina, pero no sorbosa, melibiosa, inulina, almidón, dextrina y alcoholes de azúcar. Además, tienen capacidad para fermentar carbohidratos como la lactosa, la sacarosa, la trealosa, la ramnosa y otros, varía entre cepas (Todorov *et al.*, 2022).

Gran parte de los *Pediococcus* utilizan un sistema de oxidación de lactato, este es inducible y las células pueden desviar la energía de la oxidación del lactato al acetato. En condiciones aeróbicas, el L-(+)-lactato se oxida a acetato y CO₂ en cantidades equimolares. La producción de acetato y CO₂ puede desempeñar un papel en el desarrollo de un sabor distintivo; sin embargo, en condiciones anaeróbicas, no se produce producción de acetato, pero se lleva la conversión de L-(+)-Lactato en D-(-)-Lactato, el aumento de los niveles de D-(-)-Lactato puede estar asociado a consecuencias negativas para los consumidores. (Todorov *et al.*, 2022)

Se ha descrito la aplicación de *Pediococcus* spp. como cultivo iniciador en productos alimenticios fermentados. Las cepas asociadas a la fermentación alimentaria aisladas y caracterizadas con mayor frecuencia según la mayoría de las fuentes bibliográficas son: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* y *P. halophilus*. La capacidad de la mayoría de los *Pediococcus* spp. para producir péptidos antimicrobianos, como las bacteriocinas, ha atraído el interés científico en el uso de tales cepas como cultivos protectores o bioconservantes. El uso de diferentes *Pediococcus*, como *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, se ha explorado en la fermentación del ensilaje, productos lácteos, productos cárnicos, masas y jugos de frutas. (Todorov *et al.*, 2022)

Pediococcus pentosaceus

Es una bacteria en forma de coco, grampositiva, inmóvil, homofermentativa y anaerobia facultativa con características de degradación de carbohidratos (Jiang *et al.*, 2021). Es un organismo mesófilo con un crecimiento óptimo a 28-35°C; sin embargo, puede tolerar concentraciones de sal hasta el 10%. La mayoría de las cepas de *P. pentosaceus* pueden fermentar glucosa, ribosa, galactosa, arabinosa y fructosa hasta convertirlas en DL-Lactato, solo pocas cepas pueden fermentar lactosa y xilosa. (Todorov *et al.*, 2022)

En 1990 se demostró por primera vez su aplicabilidad en la fermentación como probiótico biopromotor del crecimiento animal (utilizado para mejorar el crecimiento y salud de los animales de producción) (Jiang *et al.*, 2021). *P. pentosaceus* es ampliamente utilizado en diferentes procesos de fermentación, incluyendo la industria cervecera, la producción de productos cárnicos fermentados y fermentación de ensilaje. Esta cepa mejora el sabor y la conservación de los agentes alimentarios, e inhibe la colonización por bacterias patógenas y hongos (Todorov *et al.*, 2022).

La inoculación de *P. pentosaceus* en ensilaje resultó en una mayor digestibilidad de la materia seca que *L. plantarum*. Además, se ha recomendado el uso de probióticos

en muchas especies de *Pediococcus* debido a sus cualidades antioxidantes, antiinflamatorias, desintoxicantes e hipolipemiantes (Okoye *et al.*, 2023).

Pediococcus y el grupo *L. plantarum* representan el vínculo evolutivo entre las bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas. Aunque los *Pediococcus* y el grupo *L. plantarum* obviamente comparten características metabólicas importantes con los lactobacilos homofermentativos, están filogenéticamente relacionados con los lactobacilos heterofermentativos y las *Leuconostocaceae* (Zheng *et al.*, 2020).

2.5.2 Bacterias del ácido propiónico

Las bacterias del ácido propiónico (BAP) son grampositivas, no formadoras de esporas y anaerobias facultativas. La única especie que ha sido identificada en ensilaje es *Propionibacterium acidipropionici*. Esta bacteria puede fermentar una variedad de fuentes de carbono, como carbohidratos, polioles y ácidos orgánicos, incluidos el ácido láctico y el ácido glucónico. Los sustratos se oxidan a piruvato por glucólisis o por la vía del fosfato de pentosa; posteriormente, el piruvato se reduce a ácido propiónico a través del ciclo de Wood-Werkman o se oxida a acetato y dióxido de carbono. Los principales productos de fermentación son el ácido propiónico, acético y succínico, así como el dióxido de carbono. Tanto el ácido propiónico como el ácido acético son ácidos débiles con efectos antifúngicos. El uso de BAP como inoculantes en ensilaje tiene como objetivo principal inhibir estos microorganismos y controlar el deterioro aeróbico. Sin embargo, tales bacterias no han inhibido consistentemente el crecimiento de levaduras y mohos ni han mejorado la estabilidad aeróbica porque no crecen bien cuando las condiciones de ensilado conducen a una rápida reducción del pH. Aunque la mayoría de estas bacterias son anaeróbicas, tienen baja tolerancia a la acidez y no crecen bien a valores de pH inferiores a 4.8. Los datos son limitados sobre la población de BAP o sobre la identificación o supervivencia de estas bacterias en el ensilado. Esto puede deberse a su escasa supervivencia en estas condiciones o a la dificultad de cultivarlos e identificarlos cuando las poblaciones son bajas (Ávila & Carvalho, 2020).

2.5.3 Enterobacterias

Las enterobacterias son bacterias gramnegativas facultativamente anaeróbicas que se encuentran en ensilados mal conservados. El metabolismo difiere según la especie, pero generalmente se pueden producir ácido láctico, acético y succínico, etanol, 2,3 butanodiol, CO₂ y agua. Ninguno de estos compuestos es tóxico. Aunque algunos de estos ácidos producidos por enterobacterias tienen un efecto positivo en el ensilaje, la cantidad producida es insuficiente para la conservación del forraje, y el crecimiento de enterobacterias compite con las BAL por sustrato. Algunas especies del grupo de las enterobacterias pueden degradar proteínas, produciendo amoníaco y aminos biógenas, que son indeseables en el ensilado (Ávila & Carvalho, 2020).

Sin embargo, un estudio reciente sobre la ecología del ensilaje microbiano (Ogunade *et al.*, 2018) reveló que algunos géneros de enterobacterias (*Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*) tenían una correlación negativa con la concentración de amoníaco, pH y poblaciones de levaduras y mohos, y no se observó correlación con los porcentajes de ácidos láctico y acético para que las enterobacterias sean inhibidas, se estima que se requieren entre 6 y 10 mmol l⁻¹ de ácido láctico (no disociado), aproximadamente 10 veces menos que la concentración de ácido láctico en un ensilado normal (100 mmol l⁻¹). Por lo tanto, no se esperaba encontrar estas bacterias en el ensilado (Ávila & Carvalho, 2020).

2.5.4 Bacterias formadoras de esporas

Las bacterias formadoras de esporas más comúnmente encontradas en el ensilado pertenecen a los géneros *Clostridium*, *Bacillus* y *Paenibacillus*; *Clostridium* es estrictamente anaeróbico (algunas especies/cepas pueden volverse aerotolerantes), mientras que las otras dos son aeróbicas o facultativamente anaeróbicas. La formación de esporas permite la supervivencia en condiciones ambientalmente estresantes, como la limitación de nutrientes, la presión osmótica,

las temperaturas extremas, la presencia de productos químicos, los cambios de pH y la penetración de la luz ultravioleta. Las esporas germinan en las células vegetativas cuando las condiciones ambientales se vuelven adecuadas. Durante la fermentación del ensilado, este evento es indeseable, ya que estas esporas pueden sobrevivir al proceso de fermentación y volver a la actividad cuando se abre el silo (*Bacillus* y *Paenibacillus*); Además, las esporas se asocian con el deterioro aeróbico del ensilado (Ávila & Carvalho, 2020).

Cuando el ensilado es consumido por los animales, las esporas sobreviven al paso a través del tracto intestinal y su presencia en las heces puede contaminar la leche. Las esporas presentes en la leche sobreviven al proceso de pasteurización, causando problemas a la industria láctea. Las bacterias del género *Clostridium* no suelen formar parte del microbiota epífita de los cultivos y se producen a través de la contaminación del suelo o de las heces. El crecimiento de clostridios ocurre cuando el crecimiento de las BAL está estancado y el pH es demasiado alto (a menudo >5) o en ensilaje con un alto contenido de humedad. Las especies de *Clostridium*, tanto patógenas como no patógenas, se pueden encontrar en el ensilado. Las cuatro especies más frecuentemente encontradas en el ensilaje son *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* y *C. bifermentans* (Ávila & Carvalho, 2020).

2.5.5 Listeria

Listeria es un género de bacterias con un metabolismo facultativamente anaeróbico que requiere condiciones microaerófilas y puede producir ácidos a partir de glucosa sin producción de gases. El oxígeno es importante para la supervivencia y el crecimiento de esta bacteria en el ensilado. Especies como: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii* han sido identificadas en diferentes tipos de ensilaje. *Listeria monocytogenes* es la más preocupante y causa listeriosis, un tipo de infección transmitida por los alimentos con una alta tasa de mortalidad (Ávila & Carvalho, 2020).

La *Listeria* spp. forma parte del microbiota vegetal y pueden sobrevivir e incluso crecer durante la fermentación del ensilaje. Un factor importante que favorece la presencia de esta bacteria en el ensilado es su capacidad para sobrevivir al ambiente ácido y a las altas variaciones de temperatura. El pH es uno de los factores inhibidores más importantes en el ensilado, y en un ensilado bien conservado en el que el pH desciende rápidamente, la población de *Listeria* spp. se reduce. Sin embargo, no existe consenso sobre el pH del ensilado en el que se inhiben estos microorganismos. Muchos investigadores han notado que el pH debe ser <4.4. El principal efecto negativo de estas bacterias es la patogenicidad. La mejor manera de evitar su crecimiento es evitando la contaminación y realizando el ensilaje de la forma correcta, permitiendo la rápida caída del pH y la anaerobiosis. Una caída rápida del pH se asocia con el crecimiento intenso de BAL, que también puede inhibir la *Listeria* spp., mediante la producción de bacteriocinas (Ávila & Carvalho, 2020).

2.5.6 Bacterias del ácido acético

Las bacterias del ácido acético son gramnegativas y tienen una alta tolerancia a las condiciones ácidas. Estas bacterias provocan la oxidación incompleta de los alcoholes, el azúcar y el ácido láctico. La mayoría son aeróbicas, por lo que se han identificado en las etapas aeróbicas de la fermentación, principalmente en la fase de apertura, asociadas al deterioro aeróbico. La acción de estas bacterias ha sido descrita como negativa por su uso de hidratos de carbono y productos de fermentación, lo que puede provocar un aumento del pH y pérdida de MS en forma de CO₂, iniciando así el deterioro aeróbico. Sin embargo, el ácido acético, producto de su metabolismo, puede tener una acción antifúngica y aumentar la estabilidad aeróbica. La especie más comúnmente encontrada es *Acet. pasteurianus*, pero también se han identificado los géneros *Gluconobacter*. El ácido acético puede ser un factor en la reducción de la ingesta de ensilaje. Sin embargo, más importante que la concentración de ácido acético en el ensilado es su origen, es decir, el

microorganismo productor, ya que la reducción de la ingesta puede ser una función de otros metabolitos producidos por este microorganismo (Ávila & Carvalho, 2020).

2.5.7 Levaduras

Las levaduras están ampliamente diseminadas en el medio ambiente y sobreviven en una amplia variedad de condiciones de temperatura, pH y osmolaridad. Como microorganismo de deterioro del ensilaje, su tolerancia al ácido es una característica indeseable. La capacidad de tolerar ambientes ácidos, de permanecer viables en ausencia de oxígeno y de utilizar el ácido láctico como fuente de carbono permite que este grupo de microorganismos crezca rápidamente cuando el ensilado se expone al aire durante la fase de alimentación. Los principales problemas asociados a la presencia de levaduras en el ensilado son una alta pérdida de materia seca en forrajes ensilados con altas concentraciones de carbohidratos solubles en agua y la baja estabilidad aeróbica del ensilado que incluye una alta población de levaduras que utilizan ácido láctico. Sin embargo, las consecuencias de la presencia de levaduras en el ensilado dependen de la especie y el metabolismo de este microorganismo (Ávila & Carvalho, 2020).

Las levaduras realizan la respiración aeróbica y la fermentación. Cuando se encuentran en un entorno aeróbico, utilizan preferentemente la ruta aeróbica, lo que resulta en una mayor eficiencia de crecimiento. En ambientes anaeróbicos, son fermentadores, capaces de producir una importante variedad de metabolitos. La levadura más frecuentemente descrita en diferentes tipos de ensilaje es *Issatchenkia orientalis* (*Pichia kudriavzevii* o *Candida krusei*), esta levadura puede asimilar el ácido láctico (Ávila & Carvalho, 2020).

Algunos factores pueden favorecer el crecimiento de levaduras en el ensilado, como la mayor disponibilidad de carbohidratos solubles en agua, temperaturas más bajas (20 °C) y la entrada de aire durante la fermentación. El ácido láctico producido durante la fermentación puede ser una fuente de energía para la supervivencia de la levadura. Los ácidos grasos de cadena corta con alto valor de pKa (ácidos

débiles) pueden inhibir las levaduras en condiciones de pH bajo; las levaduras se consideran indeseables; sin embargo, contrariamente, la especie *Saccharomyces cerevisiae*, son ampliamente utilizadas como probióticos para rumiantes, realizando importantes funciones ruminales (Ávila & Carvalho, 2020).

2.5.8 Mohos

Los mohos pueden estar presentes en el ensilado durante todas las etapas de la fermentación. La diversidad de estos mohos cambia durante la fermentación del ensilado y su crecimiento en este alimento provoca una pérdida de nutrientes, una posible contaminación por micotoxinas y la posibilidad de enfermedades fúngicas a través de la colonización de tejido animal, como la aspergilosis. La población estimada de mohos en el ensilado está asociada a su calidad higiénica. Los recuentos de 4 log UFC por gramo se consideran el límite recomendado por las buenas prácticas de fabricación en alimentación animal. Sin embargo, el recuento de la población de moho es insuficiente porque es posible que no se observe el crecimiento del moho, mientras que las micotoxinas producidas por él pueden estar presentes y activas en el ensilado (Ávila & Carvalho, 2020).

Las micotoxinas son productos del metabolismo secundario de los mohos, y su producción depende de ciertas condiciones que pueden estar relacionadas con la exposición a condiciones adversas (disponibilidad de nutrientes, pH, actividad del agua, temperatura, presencia de otros microorganismos) específicas para cada especie de moho. Las micotoxinas no presentan problemas para la conservación del ensilado; Sin embargo, si son consumidos por un animal, pueden causar daños graves, como intoxicación mortal, y síntomas subclínicos, como supresión del sistema inmunitario, reducciones en la producción y la conversión alimenticia, aumento de infecciones y desequilibrios hormonales, además del daño potencial a los animales, las micotoxinas consumidas en la dieta pueden transferirse a la leche y la carne producidas (Ávila & Carvalho, 2020).

2.6 Físicoquímica del ensilaje

2.6.1 Materia seca

Las pérdidas de materia seca y los cambios de calidad ocurren durante cada una de las etapas del proceso de ensilado, reduciendo así la calidad del producto. Las principales etapas en las que comienzan las pérdidas son en la cosecha del campo, la respiración de los silos y la fermentación, la producción de efluentes y exposición al oxígeno durante las fases de almacenamiento y alimentación, suelen ser cruciales para esta pérdida (Borreani *et al.*, 2018).

En condiciones de campo y pre-ensilado, todos los forrajes que no se cosechan y conservan directamente necesitan un período de marchitamiento del campo para reducir su concentración de humedad, para mejorar sus características de ensilabilidad (es decir, aumentar la concentración de carbohidratos solubles en agua y reducir la actividad del agua) y evitar las filtraciones pérdidas del silo. Los principales procesos de campo involucrados en los cultivos que se marchitan son: la siega, el secado (marchitamiento) y el empacado o picado, y durante cada uno de estos procesos se producen pérdidas de materia seca (MS) y cambios de calidad en el producto final. Lograr un marchitamiento rápido en el campo es esencial para reducir las pérdidas de MS y de valor nutritivo. El acondicionamiento del forraje y la distribución del cultivo inmediatamente después del corte tiene un efecto importante en la tasa de secado del forraje (Borreani *et al.*, 2018).

El llenado lento del silo y el retraso en el sellado del mismo, también afectan negativamente la calidad del ensilado. En el momento del ensilado, el forraje picado sigue metabólicamente activo y respira mientras el oxígeno está disponible. La respiración del tejido vegetal es el factor principal que elimina el oxígeno del silo y produce calor, del mismo modo, la respiración de los microorganismos aeróbicos puede contribuir. Las pérdidas asociadas con la fermentación en el silo se deben principalmente a la producción de dióxido de carbono. Estas pérdidas suelen oscilar entre el 2 y 4%. (Borreani *et al.*, 2018).

Las pérdidas de materia seca, especialmente de hojas, se relacionan directamente con el contenido de MS del forraje en el momento del tratamiento y la severidad del acondicionamiento. Antes de que comience la fase de fermentación activa, el oxígeno atrapado en el forraje empacado, permite que se produzcan procesos biológicos y químicos que consumen nutrientes y energía, lo que lleva a la producción de agua, dióxido de carbono, calor y amoníaco libre. Esto aumenta la temperatura del ensilado y lo afecta negativamente, tanto en términos de pérdida de materia seca como de calidad. La cantidad de pérdida de materia seca por fermentación depende de las especies microbiológicas dominantes y de los sustratos fermentados (Borreani *et al.*, 2018).

2.6.2 Azúcares

El éxito de la fermentación en un ensilado depende primordialmente de la disponibilidad de carbohidratos solubles en agua (WSC, por sus siglas en inglés). En el caso del *Agave salmiana*, la reserva energética principal no es el almidón, sino los fructanos, que son polímeros complejos de fructosa unidos a una unidad de glucosa. Pinos-Rodríguez *et al.* (2008) señalan que la composición química del agave varía con la edad de la planta, pero mantiene consistentemente una alta carga de estos azúcares fermentables, lo que lo convierte en un sustrato ideal para la conservación biotecnológica.

Los azúcares reductores, representados principalmente por la glucosa y la fructosa, son las moléculas que poseen un grupo carbonilo libre capaz de donar electrones. En el ensilado, estas moléculas actúan como el sustrato inmediato para las bacterias ácido lácticas (BAL); de acuerdo con McDonald *et al.* (1991), las BAL transforman estos azúcares mediante la fermentación en ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, lo cual es el mecanismo fundamental para reducir el pH y garantizar la estabilidad aeróbica del material ensilado.

Durante el proceso fermentativo, ocurre una dinámica particular conocida como hidrólisis de los carbohidratos complejos. Al inicio del proceso, las enzimas de la

planta y la acidificación del medio rompen los fructanos y la sacarosa, liberando nuevas unidades de azúcares reductores. Wang *et al.* (2023) explican que esta liberación constante de monómeros asegura una fuente de energía continua para inóculos especializados, permitiendo que la producción de lactato sea sostenida incluso en etapas avanzadas de la fermentación.

Finalmente, la medición de los azúcares reductores totales sirve como un indicador de la eficiencia metabólica del sistema. Un consumo rápido y marcado de estos azúcares, correlacionado con un descenso drástico del pH, es evidencia de una fermentación exitosa. Según Su *et al.* (2021), la capacidad de un inóculo para agotar eficientemente estos recursos frente a la microbiota nativa es lo que define la calidad sanitaria y nutricional del forraje final, evitando la proliferación de microorganismos indeseables que degradarían la proteína del agave.

2.6.3 pH

Medir el valor del pH es una de las formas más sencillas de comprobar si ha habido una fermentación adecuada y, por lo tanto, es una forma sencilla de comparar el rendimiento de diferentes cepas. En general, el ensilado bien conservado tiene valores de pH inferiores a 4,2. Sin embargo, la medición del pH por sí sola es insuficiente para sacar conclusiones más profundas sobre la fermentación del ensilado (Carvalho *et al.*, 2021).

La capacidad buffer (CB) se puede definir como la resistencia que tiene el material ensilado en relación a la baja del pH, pues aun cuando ocurra la producción de ácidos, las plantas forrajeras que poseen alta capacidad buffer, como las gramíneas jóvenes y la alfalfa, pueden presentar altas pérdidas de nutrientes y energía durante el proceso fermentativo, ya que las sustancias buffer, como las sales minerales, contenido de nitrógeno y ácidos orgánicos, impiden la baja del pH (Macêdo *et al.* 2019).

El pH de una muestra ensilada es una medida de su acidez. Durante el ensilado, el ácido láctico (pKa de 3,86), producido por las bacterias del ácido láctico (BAL), suele

ser el ácido que se encuentra en la concentración más alta en los ensilados, y es el que más contribuye a la disminución del pH durante la fermentación porque es aproximadamente de 10 a 12 veces más fuerte que cualquiera de los otros ácidos principales [por ejemplo, el ácido acético (pKa de 4,75) y el ácido propiónico (pKa de 4,87)] que se encuentran en los ensilados. El pH final del ensilado se ve afectado por muchos factores, pero está más relacionado con la concentración de ácido láctico y la capacidad tampón del cultivo (Kung *et al.*, 2018).

El bajo pH del ácido láctico estabiliza la fermentación del ensilado al inhibir el crecimiento o matar los microbios intolerantes a un pH bajo. Sin embargo, a medida que la MS aumenta por encima del 40 al 45%, el pH del ensilado aumenta. Esto ocurre porque el agua metabólica disponible para el crecimiento de las bacterias del ácido láctico comienza a ser limitante a medida que aumenta la MS del ensilaje (Kung *et al.*, 2018).

El tratamiento con un inoculante de ácido homoláctico puede resultar en un pH de ensilaje más bajo en comparación con un ensilado no tratado debido a la mayor producción de ácido láctico (Kung *et al.*, 2018)

2.6.4 Ácido láctico

Químicamente conocido como ácido 2-hidroxiopropanoico, el LA es una molécula quiral y existe principalmente en forma asimilativa de "L (+)" (Agrawal & Kumar, 2023).

El ácido láctico o lactato, es un importante compuesto de plataforma de base biológica, que se puede dividir en ácido D-láctico y ácido L-láctico según su rotación óptica. La enzima lactato hidrogenasa es la clave para que las bacterias transformen el piruvato en ácido láctico, y su estereoespecificidad determina la configuración del ácido láctico. El ácido D-láctico y el ácido L-láctico son catalizados por la D-lactato deshidrogenasa y la L-lactato deshidrogenasa, respectivamente. El tipo óptico de

ácido láctico sintetizado por los microorganismos depende de los niveles de expresión de D-lactato y L-lactato deshidrogenasa en la cepa (Wang *et al.*, 2021).

Según la investigación, el D-LA y el L-LA son dos isómeros ópticos del ácido láctico que difieren significativamente en su metabolismo en el rumen. El metabolismo del D-LA en el rumen es relativamente lento y, aunque algunos microorganismos del rumen pueden convertirlo en ácido propiónico o ácido acético, la eficiencia de conversión es limitada. Si el contenido de D-LA en el alimento para ensilado es demasiado alto, puede provocar un desequilibrio en el entorno ruminal e incluso plantear un riesgo de acidosis ruminal. Por el contrario, el L-LA se metaboliza más fácilmente rápidamente en ácido propiónico por los microorganismos del rumen, que es una de las principales vías del metabolismo microbiano ruminal. Por lo tanto, la acumulación de L-LA en el rumen es menor, lo que ayuda a mantener la estabilidad del entorno ruminal (Zhao *et al.*, 2024).

El rendimiento y la productividad de la producción de LA dependen del pH (3,5-9,6), la temperatura (5-45 °C), la presencia de nutrientes (como aminoácidos, péptidos, nucleótidos y vitaminas) y los productores de cepas de BAL utilizados (Abedi & Hashemi, 2020).

Las concentraciones típicas de ácido láctico en los ensilados comúnmente alimentados oscilan entre el 2 y el 4% de la MS, pero pueden ser considerablemente más altas en ensilajes con bajas concentraciones de MS <30%; En condiciones normales de alimentación, el ácido láctico del ensilado se convierte en ácido propiónico en el rumen (Kung *et al.*, 2018).

El ácido láctico es crucial en la fermentación del ensilaje, ya que desempeña múltiples funciones clave: (1) reduce el pH, evitando el crecimiento de microorganismos dañinos como el moho y las bacterias de deterioro; (2) inhibe las enzimas que causan la degradación del alimento, preservando así la calidad del alimento; (3) contribuye a la producción de compuestos aromáticos que mejoran el apetito de los animales; (4) actúa como fuente de energía para los animales, aumentando el valor energético del alimento; y (5) promueve la salud digestiva al

mantener el equilibrio microbiano en el tracto gastrointestinal, mejorando la digestibilidad del alimento (Zhao *et al.*, 2024).

2.6.5 Ácidos volátiles

El ácido acético es el ácido que se encuentra en la segunda concentración más alta en el ensilado, que generalmente oscila entre el 1 y el 3% de Materia Seca (MS), está inversamente relacionada con el contenido de MS. Cuando el rumiante consume el ácido acético en el ensilaje, puede ser absorbido en el rumen y utilizado como energía o incorporarse a la leche o a la grasa corporal. Las concentraciones moderadas de ácido acético en el ensilado suelen ser beneficiosas porque inhiben las levaduras, lo que resulta en una mejor estabilidad del ensilado en la fase de alimentación, pero, cuando presenta una concentración baja de este ácido, puede ser muy inestable cuando se expone al aire; una concentración excesivamente alta (4-6%) se detectan con mayor frecuencia en ensilajes extremadamente húmedos (>70% de humedad) caracterizados por fermentaciones no deseadas (pero naturales) dominadas por enterobacterias, clostridios o bacterias del ácido heteroláctico (Kung *et al.*, 2018).

El ácido propiónico suele ser indetectable (especialmente en ensilados más secos) o en concentraciones muy bajas (<0,1%) en ensilados buenos. Las altas concentraciones de ácido propiónico (>0,3-0,5%) se encuentran comúnmente en las fermentaciones clostridiales, probablemente como resultado de *Clostridium propionicum* (Kung *et al.*, 2018).

El ácido butírico no debe ser detectable en ensilados bien fermentados. La presencia de este ácido indica actividad metabólica de los organismos clostridiales, lo que conduce a grandes pérdidas de materia seca y una mala recuperación de energía. Algunos clostridios son capaces de fermentar azúcares en ácido butírico (sacarolítico), algunos pueden convertir el ácido láctico en butírico, y algunas especies son altamente proteolíticas. Además de la presencia de ácido butírico y concentraciones de ácido láctico más bajas de lo normal, los ensilajes clostridiales a

menudo se caracterizan por un pH más alto de lo normal y concentraciones más altas de lo normal de ácido acético, $\text{NH}_3\text{-N}$ y proteínas solubles. Los ensilados clostridiales tienden a tener altas concentraciones de fibra y baja digestibilidad de MS porque gran parte de los nutrientes solubles fácilmente disponibles se han degradado (Kung *et al.*, 2018).

2.6.6 Proporción ácido láctico: ácido acético

La proporción de ácido láctico y ácido acético se usa comúnmente como un indicador cualitativo de la fermentación. Las buenas fermentaciones de ensilado suelen tener una proporción de estos ácidos de aproximadamente 2,5 a 3,0. En los ensilajes tratados con un inoculante de ácido homoláctico, se puede encontrar una proporción ligeramente mayor de ácido láctico y ácido acético porque las bacterias del ácido láctico homoláctico producen sólo ácido láctico. Por el contrario, los ensilajes tratados con un inoculante heteroláctico, tendrán concentraciones más altas de ácido acético y una menor proporción de ácido láctico a ácido acético que los ensilados no tratados, debido al metabolismo de parte del ácido láctico a ácido acético; esto no debe tomarse como un indicador de una mala fermentación. Los ensilajes con niveles muy altos de proporción de ácido láctico: ácido acético a veces pueden ser más inestables aeróbicamente que aquellos con proporciones normales porque las bajas concentraciones de ácido acético pueden no ser suficientes para inhibir las levaduras que asimilan lactato. Las proporciones de ácido acético por debajo de 1 suelen ser una indicación de fermentaciones anormales (Kung *et al.*, 2018).

2.6.7 Nitrógeno soluble y N amoníaco

Los procesos proteolíticos de plantas y microorganismos conducen a cambios en los compuestos nitrogenados de los ensilados. La fermentación da lugar a un aumento del N soluble (entre el 55 y el 60% del N total) y del $\text{NH}_3\text{-N}$ (normalmente

menos del 10-15% del N total). En general, los ensilados de alta humedad tienen concentraciones más altas de N y NH₃-N solubles que los ensilados más secos debido a la fermentación general más robusta en los primeros. (Kung *et al.*, 2018).

2.6.8 Olor del ensilado

Los ensilados bien fermentados no deben tener un olor fuerte y particular porque el ácido láctico, el principal ácido orgánico de la fermentación, es casi inodoro. Sin embargo, la mayoría de los ensilados tienden a tener un suave olor a vinagre (ácido acético) porque este ácido se produce en la segunda concentración más alta después del ácido láctico y es muy volátil. Los ensilajes con un olor afrutado y dulce se asocian erróneamente con ser un alimento estable y bien fermentado. En realidad, estos olores se deben generalmente a altas concentraciones de alcohol (etanol) que son producidas principalmente por levaduras, pero también por muchas bacterias. Los clostridios sacarolíticos (*Clostridium tyrobutyricum* y *Clostridium butyricum*) generalmente se encuentran en el ensilaje y utilizan azúcares solubles o ácidos orgánicos (lácticos) para producir ácido acético y ácido butírico, que tiene un olor fuerte y fétido a mantequilla rancia. La proteólisis excesiva puede dar un olor pútrido, a pescado o a amoníaco. Los ensilados clostridiales suelen tener un aspecto viscoso de color verde oliva (Kung *et al.*, 2018).

2.6.9 Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios prevalentes en muchas plantas (Kholif, 2023), químicamente se conocen como triterpenos y glucósidos esteroideos y son moléculas estructuralmente diversas (Sj *et al.*, 2021). Su nombre se debe a su capacidad para formar una espuma estable en soluciones acuosas como el jabón. Las saponinas esteroideas se encuentran principalmente en monocotiledóneas y su concentración es mayor en las hojas jóvenes que en las maduras y es mayor en las raíces que en el follaje, en las plantas en realidad no se

encuentran como un solo compuesto, sino como muchos compuestos con diversos restos de azúcar (Kholif, 2023).

La mayoría de las plantas contienen saponinas en sus diferentes partes, como la raíz, el tubérculo, la corteza, las hojas, la semilla y el fruto. Las plantas sintetizan saponinas como barrera química o escudo para mejorar su sistema de defensa para proteger sus tejidos. Por lo tanto, se encuentran en altas concentraciones en los tejidos que son más susceptibles al ataque de patógenos o a la depredación de insectos. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos ha declarado que las saponinas son "generalmente reconocidas como seguras" tanto para el consumo humano y animal, para este último, tienen la capacidad de modular la fermentación ruminal y mejorar la producción animal (Kholif, 2023). Sin embargo, en concentraciones excesivas las saponinas afectan negativamente la absorción de nutrientes, ya sea por inhibición enzimática durante la digestión o por una interacción con el zinc, mientras que son la principal causa de sabores indeseables que se producen después de su consumo. Por lo tanto, a pesar de sus acciones beneficiosas para la salud del consumidor, las saponinas se consideran componentes no deseados en los alimentos (Sj *et al.*, 2021).

En el contexto de alimento para ganado, el estudio de Yanza *et al.* en 2024 se centró en la utilización de extractos de saponinas como aditivo dietético en la nutrición de rumiantes y reveló que varios niveles de extracto de saponina de hasta 40 g/kg MS no afectaron negativamente la ingesta de alimento, sin embargo, se encontró que el tipo de animal y la ingesta dietética de extracto de saponina interactuaban, y se sugiere que los grandes rumiantes tienen una palatabilidad más diversa para tolerar el sabor amargo de las saponinas que los pequeños rumiantes. Esta evidencia indica que los grandes rumiantes pueden mitigar naturalmente los efectos adversos del extracto de saponina y tener una utilización más eficiente de la energía cuando se alimentan con dietas que contienen extracto de saponina.

2.6.10 Oxalatos

Los cristales de oxalato cálcico o cristales ergásticos están presentes en la mayoría de las plantas en todos los órganos. Algunas familias de plantas tienen una mayor acumulación de cristales, como la familia Agavaceae (Nayagam & Rajan, 2021). Los oxalatos existen en la célula vegetal como productos finales metabólicos, como sales solubles o sales insolubles (Temür *et al.*, 2021).

La presencia de estructuras como el oxalato de calcio proveen a las plantas del género *Agave* características únicas debido a su gran capacidad de secuestrar y mantener los niveles de calcio dentro de la planta, además de la protección fitosanitaria, desintoxicación (metales pesados, ácido oxálico, entre otros), equilibrio iónico, apoyo del tejido y rigidez de la planta, y recolección y reflexión uniforme de la luz (Bernardino-Nicanor & González-Cruz, 2023).

Dentro de la planta, se forman fuertes enlaces entre el ácido oxálico y otros minerales, como el calcio, el magnesio, el sodio y el potasio. Esta combinación química da como resultado la formación de sales de oxalato. Algunas sales de oxalato, como el sodio y el potasio, son solubles, mientras que las sales de oxalato de calcio son básicamente insolubles. El oxalato de calcio insoluble tiende a precipitarse (o solidificarse) en los riñones o en el tracto urinario, formando así cristales de oxalato de calcio de bordes afilados cuando los niveles son lo suficientemente altos. Estos cristales desempeñan un papel en la formación de cálculos renales en el tracto urinario (Sj *et al.*, 2021).

A menudo, se observan cristales de oxalato de calcio depositados cerca de los haces vasculares, cerca de los elementos del xilema. De este modo, las plantas secuestran, dividen y transportan el calcio a lo largo y ancho de su estructura y órganos. Secuestrar el exceso de calcio en forma inactiva como cristales de oxalato de calcio (CaOX) en una medida eficaz para minimizar la toxicidad. Estos tienen una importante función fisiológica de regulación del calcio, ya que almacenan el exceso de calcio en forma de cristales, e incluso sirven como un proveedor interno de carbono incluso cuando los estomas están cerrados, lo que conduce a una nueva

vía fotosintética llamada fotosíntesis de alarma. Algunos estudios demuestran que los cristales de CaOX tienen una interesante función de reflejar la luz de manera uniforme para el cromoplasto evitando la fotooxidación, algunos otros señalan que estos cristales son una efectiva defensa contra los insectos perforadores de la corteza (Nayagam & Rajan, 2021)

La concentración de minerales se encuentra relacionada con la ubicación de las hojas dentro de la roseta así como con el tiempo de desarrollo de la planta, mostrando diferencias significativas en cuanto al tamaño de los cristales de oxalato, de acuerdo con el tiempo de desarrollo de la planta y la ubicación de la hoja en la roseta serán las necesidades metabólicas de la planta, las cuales se ven reflejadas en la presencia de mayor o menor concentración de minerales (Bernardino-Nicanor & González-Cruz, 2023).

Estos cristales tienen muchas funciones en las plantas, pero actúa como un antinutriente cuando se consume en exceso a través de alimentos crudos o medicamentos crudos a base de plantas (Nayagam & Rajan, 2021).

La sensibilidad de los rumiantes a las plantas con oxalatos es variable. Las ovejas son más sensibles a los oxalatos que el ganado vacuno. La cantidad de planta ingerida, el tiempo de alimentación, el contenido de oxalato soluble, la existencia de otros piensos como factor de dilución en el rumen y la sensibilidad previa al oxalato son los factores efectivos que determinan la sensibilidad de los rumiantes. Aunque no hay envenenamiento en los animales, las sales solubles de oxalato que se toman continuamente en pequeñas cantidades, se absorben y entran en la circulación. Este oxalato se combina con el calcio de los fluidos corporales y reduce la intensidad del calcio plasmático, así como de los glóbulos rojos. Los cálculos renales se forman como resultado de la sedimentación de cristales de oxalato de calcio en los túbulos renales, lo que resulta en insuficiencia renal. La deposición de cristales de oxalato de calcio en el sistema nervioso central causa trastornos como la parálisis (Temür *et al.*, 2021).

3. Antecedentes

El interés inicial en las bacterias ácido lácticas como microorganismos fue impulsado por la mera práctica relacionada con la industria alimentaria y de fermentación. Louis Pasteur, considerado por la mayoría como el padre de la microbiología e inmunología, era un químico que sentó muchas bases teóricas de lo que hoy conocemos en el campo; en sus investigaciones de 1856 sobre los problemas de la fermentación inadecuada, detectó dos fermentaciones: una láctica y una alcohólica, ambas inducidas por microorganismos, Pasteur describió por primera vez el ácido láctico como el producto de una fermentación microbiana, y sometió la mezcla a altas temperaturas para lograr la pasteurización y matar así los microorganismos, esto le permitió lograr una fermentación predecible mediante la introducción de cultivos microbianos puros (Holzapfel & Wood, 2014). En 1873, J. Lister obtuvo el primer cultivo puro de una bacteria del ácido láctico (BAL) al que llamó "Bacterium lactis" (*Lactococcus lactis*) esto, al realizar diluciones de leche para aislar a la bacteria responsable de la producción del ácido láctico; y a partir de 1890, se empezaron a utilizar cultivos iniciadores para la producción de queso y leche agria, si bien es entendido que el hombre ha consumido alimentos fermentados desde hace más de 5000 años, pero no fue hasta años recientes que el hecho científico fue focalizado. En 1919, S. Orla-Jensen publicó la primera monografía dedicada a las BAL, consolidando su estudio y aplicación en la fermentación de alimentos. A partir de estos hallazgos, surgen múltiples estudios posteriores que han sentado las bases de lo que hoy conocemos sobre las bacterias ácido lácticas y la fermentación (König & Fröhlich, 2017).

3.1 Ecología de las Bacterias Ácido Lácticas

Los diversos géneros, especies y cepas de las BAL habitan y enfrentan ambientes específicos con el fin de ejercer funciones específicas o múltiples de acuerdo con sus determinantes estructurales y vías metabólicas. Estas, difieren en morfología, temperatura óptima de crecimiento y tolerancia a la misma, tolerancia a la sal,

niveles de pH bajos, metabolismos y moléculas secretadas. Este tipo de bacterias se pueden encontrar en casi todas partes, aunque su carga total y abundancia relativa en los ecosistemas microbianos son extremadamente diversas y dependen del entorno específico. La presión selectiva ejercida por estos entornos es un factor clave en la diversidad genómica entre las cepas de BAL derivadas de distintos hábitats, por ello, estas bacterias se adaptan a diversas condiciones y cambian su metabolismo en consecuencia (George *et al.*, 2018).

En general, las bacterias ácido lácticas se encuentran en hábitats ricos en nutrientes, como lo son: material vegetal y frutas en descomposición, en productos lácteos, carne y pescado fermentados, remolacha, patatas, el chucrut, masa madre, verduras encurtidas, los ensilados, las bebidas fermentadas, las plantas, el agua, los zumos, las aguas residuales y en las cavidades (bucales, genitales, intestinales y respiratorias) de humanos y animales. De igual manera, forman parte del microbiota sano del intestino humano. Aparte de la caries dental, los *Lactobacillus* suelen considerarse apatógenos. Algunas especies se utilizan como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos. Gracias a la acidificación, evitan el deterioro de los alimentos y el crecimiento de microorganismos patógenos. Algunas BAL se emplean como probióticos, que son células bacterianas potencialmente beneficiosas para el ecosistema intestinal de los seres humanos y otros animales (Holzapfel & Wood, 2014).

Estas bacterias pueden crecer a temperaturas que oscilan entre 5 y 45°C y en un rango de pH de 3.5 a 10.0; por lo tanto, las condiciones ideales para el crecimiento varían según la cepa, para esto, necesitan de ciertas sustancias para prosperar, incluidas las fuentes de carbono y nitrógeno como aminoácidos, carbohidratos, vitaminas y minerales (Stephen & Saleh, 2023).

3.2 Aplicaciones en la industria alimentaria y agrícola

La actual demanda global de alimentos seguros, sostenibles y de alta calidad, así como la necesidad de reducir el impacto ambiental en las actividades humanas, ha

adoptado e innovado, cada vez de manera más común, soluciones biotecnológicas para solucionar los distintos problemas a los que se enfrenta la población. En este contexto, las bacterias ácido lácticas (BAL) han emergido como microorganismos clave debido a su capacidad para fermentar y preservar alimentos, mejorar la calidad de los productos agrícolas y ganaderos, y promover prácticas más sostenibles.

Las bacterias ácido lácticas desempeñan un papel multifacético en los sectores de alimentación, agricultura, medicina, entre otros, y la Administración de Alimentos y medicamentos las reconoce como generalmente segura (GRAS). Así es como su aplicación resalta en múltiples escenarios, pero, para llegar a ello fue necesario en un inicio identificar y aislar la bacteria de interés de un medio habitual en el que se encontraba, puede ser de material vegetal en descomposición, vegetales, frutas, productos lácteos, alimentos fermentados, bebidas fermentadas, ensilajes, jugos, aguas residuales, tractos gastrointestinales, cavidades de humanos y animales, etc. (Śliżewska & Chlebicz-Wójcik, 2020).

Las BAL son candidatas prometedoras para la síntesis de otros compuestos, como edulcorantes, vitaminas, bacteriocinas, exopolisacáridos (EPS), enzimas lignocelulósicas, metabolitos (L-alanina, diacetol, manitol y sorbitol), etc. Estos compuestos son conocidos por sus variadas funciones, incluida la biopreservación y la mejora de los componentes nutricionales de los ensilados. Esta mejora nutricional amplía el uso de inoculantes LAB que sintetizan vitaminas específicas en alimentos fermentados. Además de las vías enumeradas anteriormente (Okoye *et al.*, 2023).

Las bacterias ácido lácticas homofermentativas se han propuesto como microorganismos altamente favorables para aplicaciones industriales debido a su importante viabilidad comercial en áreas como la alimentación y la bioconservación, la utilización de probióticos y los procedimientos de biodegradación. Por lo tanto, la identificación de una BAL homofermentativa es un factor crítico en el desarrollo de un bioproceso económico para la producción de ácido láctico. Los principales candidatos homofermentativos que son más utilizados, incluyen los géneros

Lactococcus, *Lactobacillus* y *Enterococcus*. En los últimos años la producción de ácido láctico por cepas BAL procedentes de diversos materiales orgánicos ha cobrado cada vez más importancia en el campo de la biotecnología. Los microorganismos que se utilizan en aplicaciones comerciales exhiben una tasa de fermentación rápida cuando se utilizan materias primas de bajo costo, producen cantidades mínimas de biomasa celular y otros subproductos en pequeñas cantidades y producen altas concentraciones de ácido láctico estereoespecífico (Stephen & Saleh, 2023).

El proceso de fermentación es altamente eficiente y rentable, ya que funciona sin la necesidad de procedimientos complejos. Las cepas más beneficiosas económicamente dentro del grupo, son las cepas de *Lactobacillus* debido a su alta productividad, rendimiento y alta tolerancia a los ácidos. Además, que es posible alterarlos de forma controlada para generar específicamente L/D-láctico. (Stephen & Saleh, 2023).

Las desventajas de utilizar BAL para la producción comercial de ácido láctico incluyen altas demandas de nutrientes y riesgos de contaminación debido a las bajas temperaturas de fermentación (<45°C). Debido a su alto rendimiento (casi al máximo valor teórico), productividad y excelente pureza óptica (>99%) de ácido láctico, las BAL homofermentativas son el único método disponible para la producción comercial (más de 100 g/L de ácido láctico) (Stephen & Saleh, 2023).

Otro de los usos del poder fermentador de las bacterias ácido lácticas es como aditivo en el ensilaje, ya que la inoculación con BAL podría aumentar el contenido de ácido láctico, disminuir el pH, y ayudan a mejorar el perfil de fermentación del ensilado y mejorar la calidad del alimento. Estudios previos han demostrado que la inoculación de BAL en ensilajes puede reducir las pérdidas de materia seca y aumentar la estabilidad aeróbica, la tasa de degradabilidad y el rendimiento de los animales. Recientemente, se han desarrollado inoculantes de doble propósito que contienen bacterias homofermentativas y heterofermentativas para superar las limitaciones de los inoculantes que contienen cualquiera de los dos tipos de bacterias por sí solas, y la combinación de ambos tipos de organismos puede

mejorar la velocidad de fermentación y mejorar la estabilidad aeróbica (Stephen & Saleh, 2023).

Por ello, es que su exploración resulta cada vez más intrigante, en el descubrimiento de nuevas cepas de fermentación que hagan un trabajo más eficiente, rápido y eficaz que sus predecesoras en la industria.

3.3 Aditivos en los ensilados

Los aditivos son sustancias añadidas en el momento del ensilado que tienen como objetivo estimular la fermentación láctica, inhibir la fermentación por microorganismos indeseables y, en consecuencia, reducir las pérdidas fermentativas, lo que puede mejorar el valor nutricional del ensilado. Además, el uso de aditivos en el ensilado puede promover mejoras en la estabilidad aeróbica, un mayor consumo y el rendimiento de los animales. Sin embargo, casi ningún aditivo tiene todas estas características (Diogénes *et al.*, 2023).

Sin embargo, los métodos tradicionales de fermentación de ensilado enfrentan desafíos significativos, como largos períodos de fermentación, producción de baja acidez y calidad inconsistente, lo que limita su efectividad en la práctica agrícola moderna (Zhao *et al.*, 2024).

Así, para obtener ensilados con un perfil fermentativo adecuado, la planta debe presentar algunas características inherentes a su composición química, como un contenido de materia seca de aproximadamente el 30%, un contenido de carbohidratos solubles del 10% y una baja capacidad tampón (20 mg de NaOH/100 g MS). Sin embargo, la mayoría de las plantas no presentan estos requisitos previos, por lo que es esencial el uso de aditivos que estimulen la fermentación (Diogénes *et al.*, 2023).

Algunas de las características de un aditivo es que debe ser seguro de manejar, que mejore el proceso de fermentación, que ayude a reducir las pérdidas de materia seca, reducir el deterioro aeróbico en la alimentación, mejorar la calidad higiénica

del ensilado, limitar la fermentación secundaria, mejorar la estabilidad aeróbica, aumentar el valor nutritivo del ensilado, reducir pérdidas inevitables (asociadas con las enzimas de la planta y los microorganismos), y como resultado, aumentar la producción animal y dar al agricultor un rendimiento mayor que el costo del aditivo (Getabalew *et al.*, 2022).

Un aditivo para ensilado solo es eficaz cuando presenta resultados positivos en cuanto a la recuperación de la materia seca, disminuye el calentamiento y el moldeo durante el almacenamiento y la alimentación o en el caso de uso de un aditivo nutritivo que mejora el rendimiento animal [leche (cantidad o composición), aumento de peso, condición corporal, reproducción] (Neto *et al.*, 2020). Además, algo a tener en consideración es que la aplicación de aditivos al ensilado es un ajuste fino, ya que los aditivos no corrigen errores relacionados con el manejo del ensilaje; por lo tanto, para obtener un ensilado de alta calidad, todas las etapas del proceso deben realizarse meticulosamente (Carvalho *et al.*, 2021).

3.3.1 Clasificación

Se han empleado distintos métodos para clasificar los aditivos del ensilado, una de ellas es en algunos grupos principales, que son: inhibidores de la fermentación (ácidos, sales y otros inhibidores químicos), nutrientes (urea, amoníaco, granos, minerales, pulpas de cítricos), inhibidores del deterioro aeróbico (ácido acético, caproico y amónico, entre otros), estimulantes de la fermentación (cultivos de bacterias lácticas ácidas, enzimas y fuentes de carbohidratos) y aditivos absorbentes de humedad (Neto *et al.*, 2020).

Existe una variación en la respuesta del ensilado debido al uso de un determinado tipo de aditivo porque su eficiencia se determina en función de la dosis utilizada, de la calidad del forraje o incluso de las especies de bacterias utilizadas, en el caso del inoculante bacteriano. Además, es fundamental estandarizar la aplicación del aditivo en toda la masa a ensilar para obtener resultados satisfactorios (Getabalew *et al.*, 2022).

Inhibidores de la fermentación

Los ácidos orgánicos tienen un papel esencial como aditivos alimentarios en los rumiantes. Retrasan el deterioro al aumentar la acidez del alimento, reducen la formación y efectos de las micotoxinas, mejoran el equilibrio microbiano en el sistema digestivo y mejoran la utilización de nutrientes. Además, mejoran la calidad del ensilado y la estabilidad aeróbica al prevenir el deterioro aeróbico en ensilajes, disminuyen rápidamente el pH del ensilado, así, inhibiendo el crecimiento de microorganismos (levaduras, mohos, enterobacterias y clostridios) responsables del deterioro aeróbico (Atilgan, G. B., 2023).

Cuando se agregan los ácidos, el material vegetal se vuelve más maleable rápidamente, gracias a esto es más fácil apilarlo, comprimirlo y, por ende, eliminar el aire entre las capas. Un alto porcentaje de este ácido en el ensilado a menudo restringe la fermentación, por ello, la tasa de aplicación varía según el contenido de humedad del forraje, la duración de almacenamiento y la formulación con otros conservantes. No obstante, la acidez puede detener la respiración de las plantas y reducir la producción de calor y la pérdida de nutrientes, una acidificación rápida inhibe clostridios. Sin embargo, la adición de ácido al ensilado aumenta el efluente y puede ser potencialmente tóxico para los animales, y corrosivos para las personas, animales y maquinaria. Una opción viable al trabajar con estos aditivos, es reducir el contenido de humedad del ensilado para minimizar el efluente, y adicionar carbonato de calcio para ajustar la acidez del ensilado (Getabalew *et al.*, 2022).

Para mantener la calidad del ensilado, se pueden usar varios números de aditivos para inhibir el crecimiento de especies indeseables. Estos inhibidores se pueden agregar durante el ensilado. La adición de inoculantes de ensilaje y ácido orgánico se puede utilizar para sintetizar algunos agentes antimicrobianos (etanol, H₂O₂, exopolisacáridos, diacetilo) y plaguicidas antibacterianos (bacteriocinas) (Soundharrajan *et al.*, 2021).

Aditivos nutritivos

Los aditivos nutritivos tienen como objetivo adicionar una fuente de nutrientes al ensilado final. Minerales como el calcio, el fósforo, el azufre y el magnesio se han añadido al forraje en el momento del ensilado. Por lo general, estos no tienen ningún efecto sobre la fermentación o actúan como amortiguadores, lo que resulta en un ensilado de pH más alto. La única razón para agregar minerales es que hará que el ensilado sea más completo desde el punto de vista nutricional (Getabalew *et al.*, 2022).

La adición de amoníaco resulta en la adición de una fuente económica de proteína cruda, una vida útil prolongada de la litera durante la alimentación (estabilidad aeróbica), menos moldeo y calentamiento durante el ensilado, y la disminución de la degradación de proteínas en el silo. Mientras que, la urea se ha añadido a ensilados con la finalidad de ser una fuente económica de proteína bruta. Cuando se añaden estos aditivos se debe garantizar que las necesidades de proteínas degradables y no degradables estén equilibradas para el rumiante objetivo (Getabalew *et al.*, 2022).

Inhibidores del deterioro aeróbico

El ácido propiónico tiene la mayor actividad antimicótica. Es más débil que los ácidos fórmico y mineral, pero puede ser un aditivo útil para los ensilados. El ácido propiónico es eficaz para reducir la levadura y los mohos, que son responsables del deterioro aeróbico de los ensilados. El efecto antimicótico del ácido propiónico aumenta a medida que disminuye el pH, lo que lo convierte en un candidato ideal para mejorar la estabilidad aeróbica del ensilado donde el pH es bajo. En el pasado, la estabilidad aeróbica mejoraba cuando se añadían grandes cantidades de ácido propiónico (1% a 2% de la MS) al ensilado, pero el alto porcentaje de ácido a menudo restringía la fermentación en estos casos. La tasa de aplicación de aditivos de ácido propiónico ha variado según el contenido de humedad del forraje, la

duración del almacenamiento y la formulación con otros conservantes (Getabalew *et al.*, 2022).

Aditivos estimulantes de la fermentación

Las enzimas que digieren la fibra vegetal y el almidón, se han utilizado particularmente como aditivo, ya que participan en los procesos metabólicos, y contienen complejos enzimáticos individuales, combinaciones de complejos enzimáticos y combinación de complejos enzimáticos con bacterias ácido lácticas (Getabalew *et al.*, 2022).

Se han agregado una variedad de aditivos enzimáticos al forraje en el ensilado en un esfuerzo por mejorar la fermentación y el valor nutritivo del ensilado. En la inmensa mayoría de estos estudios se ha aplicado una mezcla de celulasas y hemicelulasas para aumentar la liberación de carbohidratos de la pared celular de la planta, poniéndolos a disposición de las BAL para fermentar a ácido láctico. Los aditivos enzimáticos se aplican casi invariablemente en combinación con inoculantes bacterianos, lo que dificulta la diferenciación entre las respuestas de ensilado bacterianas y las mediadas por enzimas (Muck *et al.*, 2018).

Hay dos razones principales para agregar enzimas que digieren la fibra al ensilado. En primer lugar, estas enzimas pueden digerir parcialmente las paredes celulares de la planta (celulosa y hemicelulosa), producir azúcares solubles que pueden ser fermentados por las BAL para reducir el pH del ensilaje. Esto estimula la fermentación del ensilado y mejora la calidad de la fermentación al aumentar la tasa y el grado de disminución del pH, aumentar la concentración de ácido láctico, mejorar la relación ácido láctico: ácido acético (que es indicativo de una mayor eficiencia de la fermentación) y, por lo tanto, reducir las pérdidas de materia seca. Una disminución más rápida del pH también limitaría la degradación y la desaminación de las proteínas del forraje y reduciría la producción de amoníaco. En segundo lugar, la digestión parcial de la pared celular de la planta puede mejorar la tasa y/o el grado de digestibilidad. Para que ocurra el primer evento, la tasa de

hidrólisis de la celulosa debe coincidir con el crecimiento temprano de las bacterias del ácido láctico (Getabalew *et al.*, 2022).

Las enzimas que digieren la fibra son más efectivas para reducir el contenido de fibra de los cultivos ensilados en el rango de humedad del 60% al 70%. Estas mejoran la fermentación al estimular la producción de ácido, reducir el pH y reducir el N amoníaco. Las condiciones de crecimiento de las enzimas para una actividad máxima, por lo general es un pH de 4,5 y una temperatura de 50°C para una actividad óptima. Sin embargo, el área de superficie, los sitios de unión, el nivel de humedad y las proteasas de las plantas también pueden inhibir la actividad enzimática (Getabalew *et al.*, 2022).

Dentro de los aditivos estimulantes de la fermentación, también se encuentran las bacterias ácido lácticas, que han sido reconocidas por su capacidad de mejorar el proceso de fermentación y calidad del ensilado, mediante su uso es posible reducir pérdidas de contenido celular, que son principalmente carbohidratos solubles, proteínas y ácidos orgánicos, que aumentan la digestibilidad, y por lo tanto la recuperación de nutrientes y energía del material vegetal. Por lo tanto, varios factores pueden interferir con la eficiencia del aditivo, como características de la cepa utilizada, temperatura, pH del ensilado, contenido de carbohidratos solubles y población de microorganismos epífitos (Neto *et al.*, 2020).

Las BAL se utilizaron generalmente como aditivos de ensilado para promover el proceso de ensilado y mejorar la calidad de la fermentación de los ensilajes finales. Algunos estudios recientes indicaron que la adición de inoculantes (que contienen cepas seleccionadas de BAL) cambió la comunidad microbiana al hacer que los microorganismos estuvieran dominados por las BAL lo antes posible (Sun *et al.*, 2021).

La fermentación depende totalmente de los tipos de microorganismos que pueden controlar el proceso. La velocidad de fermentación más rápida, la proteólisis más baja, la concentración de ácido láctico, los contenidos más bajos de ácidos acético y butírico, el menor contenido de etanol y la mayor recuperación de energía y materia seca son características observadas cuando se utilizan microorganismos

homofermentativos, mientras que las bacterias heterofermentativas tienden a utilizar el ácido láctico y la glucosa como fuente de sustrato para la producción de ácidos acético y propiónico. los cuales son efectivos en el control de hongos, bajo pH y estabilidad aeróbica (Neto *et al.*, 2020).

La inoculación de bacterias homofermentativas en el ensilaje de cultivos forrajeros promueve un inicio rápido del proceso de fermentación, ya que el dominio del medio es uniforme, donde los microorganismos actúan consumiendo los sustratos presentes, aumentando rápidamente la producción de ácido láctico, con una rápida reducción del pH del medio y que junto con el bajo potencial de reducción de oxígeno, inhibición de enterobacterias y bacterias de los géneros *Listeria*, *Bacillus* y *Clostridium* dan como resultado ensilajes bien fermentados, sin embargo, este resultado depende de la disponibilidad de suficiente sustrato fermentativo para su desarrollo.

En cuanto al uso de bacterias heterofermentativas, varios estudios apuntan a crear un equilibrio positivo entre la fermentación, el deterioro aeróbico y el rendimiento animal, produciendo ácido acético y láctico, que en conjunto son capaces de controlar microorganismos deletéreos que pueden desarrollarse en ambientes anaeróbicos y aeróbicos. Además, el ácido acético producido por las BAL heterofermentativas tiene un efecto antifúngico, que inhibe el crecimiento de levaduras y hongos filamentosos cuando el ensilado se expone al aire, potenciando la acción conjunta con el ácido láctico.

La incorporación de ingredientes de alimentos fácilmente fermentables, como el azúcar o la melaza, a forrajes tropicales con bajo contenido de MS y limitados en azúcar, es una forma de mejorar la fermentación del ensilado. La melaza de caña, se añade hasta un 10% p/p para proporcionar carbohidratos rápidamente fermentables. Pero, en condiciones de alta humedad, la melaza también puede inducir el deterioro de los clostridios, especialmente con forrajes contaminados con tierra. Debido a su viscosidad, es difícil de aplicar y debe diluirse preferiblemente con un volumen reducido de agua tibia para minimizar las pérdidas por filtración (Getabalew *et al.*, 2022).

Aditivos de absorbentes de humedad

Los productos de grado alimenticio, como los cereales en general y los subproductos procesados, como la harina de maíz o sorgo, el salvado de arroz, la harina de mandioca, la pulpa de cítricos, etc., también pueden utilizarse como aditivos, en parte para proporcionar un sustrato fermentable, pero también para dirigir el curso de la fermentación mediante la absorción de humedad excesiva (Getabalew *et al.*, 2022).

Ingredientes de piensos fácilmente fermentables, como azúcar o melaza, añadidos al material vegetal con bajo contenido de materia seca y azúcar, pueden mejorar la fermentación del ensilado. Dado que la calidad del ensilado depende de la fermentación de los azúcares en el material ensilado por las bacterias ácido lácticas, fuentes ricas en hidratos de carbono solubles en agua (WSC) tienen un efecto significativo en la mejora de la calidad del ensilado. La tasa de aplicación debe ser menor a 2.5% para aumentar el contenido de carbohidratos solubles en agua, con esta aplicación, se espera que la producción de ácido láctico aumente después de la fermentación, mientras que se espera que las pérdidas de materia seca, pH y NH₃-N disminuyan (Atilgan, G. B., 2023).

3.3.2 Importancia

Se pueden aplicar varios tipos de aditivos al principio del proceso para garantizar que la fermentación se produzca adecuadamente y para mejorar la calidad del ensilado. Estos aditivos pueden ser químicos o microbiológicos (también conocidos como cultivos iniciadores o inoculantes), siendo los aditivos microbiológicos más comúnmente utilizados (Carvalho *et al.*, 2021).

Una intuición clara y comprensible de las transiciones bioquímicas que ocurren durante el ensilado ha ayudado a la búsqueda de nuevos aditivos para el ensilado, enfatizando cepas únicas que se están volviendo más eficientes. Ciertos aditivos de

ensilado pueden ayudar a disminuir las pérdidas inevitables, especialmente aquellas que involucran enzimas vegetales, microorganismos o pérdidas de campo. Los aditivos del ensilado, químicos (ácidos fórmicos sórbicos, acéticos, propiónicos y benzoicos y sus sales) y biológicos (celulasa, bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativas), así como sus diferentes efectos, se han investigado a fondo. Estos aditivos de ensilado se añaden al forraje o a la biomasa del cultivo durante el ensilado para mejorar el proceso de ensilado (fermentación), disminuir las pérdidas de materia seca, reducir el deterioro aeróbico durante la alimentación, mejorar la calidad higiénica del ensilado, limitar la fermentación secundaria, mejorar la estabilidad aeróbica, aumentar el valor nutritivo del ensilado, inhibir las actividades de los patógenos y aumentar la producción animal al tiempo que proporciona al agricultor un rendimiento superior al coste del aditivo. Sin embargo, los aditivos biológicos, especialmente las BAL, se consideran más adecuados para la inoculación de ensilaje que otros aditivos debido a su seguridad y viabilidad, no corrosividad, respeto al medio ambiente, recuperación mejorada de materia seca, características de fermentación y rendimiento animal (Okoye *et al.*, 2023)

3.4 Aditivos microbiológicos BAL

Las bacterias ácido lácticas están presentes de forma natural en las plantas y otros sustratos que se utilizan para la producción de ensilado. Estas bacterias son esenciales para la fermentación espontánea; sin embargo, a menudo están presentes en poblaciones bajas (<5 log de unidades formadoras de colonias (UFC) por g de sustrato) o incluso por debajo de los niveles de detección (<2 log UFC) por g de sustrato). El ácido láctico producido por las BAL es el principal responsable de la conservación del ensilado, por lo que este es el principal grupo de bacterias que se ha estudiado como inoculante. (Carvalho *et al.*, 2021).

Las BAL ideales deben reproducirse rápidamente, producir ácido de manera eficiente, tolerar ambientes ácidos, resistir condiciones adversas y ser seguras (Zhao *et al.*, 2024).

Típicamente, el proceso de ensilado de los cultivos forrajeros está dominado por las BAL, y las alteraciones en las comunidades microbianas están estrechamente relacionadas con la fermentación del ensilado (Guo *et al.*, 2023). El rápido crecimiento de las BAL en la etapa inicial de ensilado y la posterior comunidad bacteriana establecida son vitales para la fermentación posterior y la calidad final del ensilado (Jie Bai *et al.*, 2022).

Con el fin de mejorar aún más la calidad de la fermentación, se han desarrollado diferentes aditivos de bacterias ácido lácticas de ensilado y se han resumido bien los efectos de estas bacterias en la fermentación del ensilado, la estabilidad aeróbica y la productividad animal (Guo *et al.*, 2023). Las bacterias lácticas son las principales responsables de la reducción del pH y de la conservación del material ensilado. El inocular con bacterias ácido lácticas, resalta con la finalidad de aumentar la abundancia de bacterias beneficiosas y disminuir la composición de microorganismos dañinos del ensilado al tiempo que aceleran la producción de ácido láctico, mejorando así la calidad nutricional, así como las características de fermentación (Chen *et al.*, 2023). En particular, los inoculantes de bacterias lácticas (BAL) desempeñan un papel importante en la mejora de la fermentación del ensilado PM, la utilización de nutrientes y la reducción de los niveles antinutricionales (Wang *et al.*, 2022).

El aditivo microbiológico o inóculo, está compuesto por cepas de una o más especies de microorganismos, que deben ser viables en el momento de su uso. La correcta elección y aplicación del inoculante son fundamentales para obtener estos efectos. Cuando se selecciona un microorganismo, se deben considerar las características específicas del sustrato objetivo, así como las condiciones generales del ambiente de ensilado para garantizar efectos óptimos. La selección cuidadosa es esencial para el éxito en la obtención de nuevas cepas para mejorar la calidad del ensilado. Una sola cepa rara vez tiene todas las características deseables necesarias para aumentar la calidad del ensilado (Carvalho *et al.*, 2021).

En general, los inoculantes se seleccionan por su capacidad para reducir rápidamente el pH del ensilado a través de la fermentación de carbohidratos

solubles en agua a ácidos lácticos, lo que inhibe aún más la actividad proteolítica y conserva los nutrientes. En la actualidad, se están realizando intentos para diseñar inoculantes (inoculantes funcionales) que no solo mejoren la calidad del ensilado, sino que también afecten positivamente la salud animal, la producción, la tolerancia al estrés y mejoren la ingesta y digestibilidad del ensilado. Algunos estudios han demostrado que los ensilados inoculados aumentaron indirectamente la producción de leche de las vacas en comparación con los no inoculados (Guo *et al.*, 2023)

En un proceso de ensilado óptimo, las bacterias del ácido láctico superan a otros microorganismos para dominar la comunidad bacteriana. Sin embargo, la competencia de las BAL contra otros microorganismos se ve afectada por múltiples factores, entre ellos el contenido de humedad, las condiciones aeróbicas y la composición de los microorganismos epífitos en el forraje fresco (Yang *et al.*, 2022). Aunque las BAL crecen más lentamente porque son metabólicamente menos eficientes, son competitivas y pueden prosperar porque emplean varios mecanismos para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, incluidos patógenos y deteriorantes (Ávila & Carvalho, 2020). Un ensilado mal fermentado o contaminado puede servir como fuente de bacterias patógenas u otros microbios indeseables. Los inoculantes de bacterias lácticas se utilizan ampliamente para garantizar la calidad del ensilado al mejorar el proceso de fermentación y la estabilidad aeróbica del ensilado. Numerosos estudios han demostrado que la aplicación de inoculantes BAL durante el ensilado podría reducir el pH del ensilado y mejorar la conservación del ensilado. Por lo tanto, los cambios en las comunidades bacterianas del ensilaje deben perfilarse para mejorar nuestra comprensión de la contribución de los inoculantes BAL a la fermentación del ensilado. Los inoculantes BAL pueden modular la dinámica de la comunidad microbiana y los cambios funcionales durante el proceso de ensilado. Además, las complejas vías metabólicas durante el ensilado están reguladas por los inoculantes a través de la degradación de los sustratos del material vegetal y la transformación de los metabolitos (Guo *et al.*, 2023).

Los inoculantes BAL comúnmente utilizados en ensilado se dividen en cultivo homofermentativo y heterofermentativo de acuerdo con sus diferentes patrones de fermentación. Básicamente, una cepa homofermentativa se utiliza a menudo para dominar la fermentación del ácido láctico y disminuir el pH en consecuencia, lo que evita el crecimiento de microbios indeseables y ayuda a preservar la masa de forraje. Mientras que, una cepa heterofermentativa se utiliza para mejorar la estabilidad aeróbica mediante la producción de ácido acético y 1,2-propanodiol (Jie Bai *et al.*, 2022).

Actualmente uno de los principales enfoques para mejorar la calidad de la fermentación del ensilado es la inoculación de bacterias ácido lácticas de tipo homofermentativo de rápido crecimiento, con el fin de dominar la fermentación, lo que resulta en un ensilado de mayor calidad, algunos de los inoculantes más comunes de este tipo incluyen: *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentacaceus* y *Enterococcus faecium*, pueden contener una o más de estas bacterias, las cuales han sido seleccionadas por su habilidad para dominar la fermentación. La mayoría de los inoculantes microbianos están disponibles en forma de polvo o gránulos. Los inoculantes que se aplican en forma seca a menudo se mezclan con carbonato de calcio, leche desnatada en polvo, sacarosa u otros portadores, y se pueden aplicar a mano o mediante dispositivos dosificadores de sólidos según las especificaciones del fabricante. Los inoculantes que se aplican de forma líquida se presentan en forma de polvos secos y se mezclan con agua justo antes de su uso (el agua clorada puede ser perjudicial para el inóculo). La aplicación se puede realizar con una simple regadera, pesando la carga de forraje entrante y ajustando la aplicación en función del tiempo medio de descarga. Un mejor método es utilizar un pulverizador de líquido dosificado para dispersar uniformemente el inóculo en el forraje. Los líquidos no utilizados se deben desechar después de un período de 24 a 48 h porque la cantidad de bacterias comienza a disminuir (Kung, 2014).

Para tener una inoculación adecuada, Kung en 2014, indica que estos microorganismos deben estar presentes en un número suficiente, la tasa de

inoculación recomendada es de 100,000 (1×10^5) UFC por gramo de forraje húmedo, hay poca evidencia que sugiera duplicar o triplicar esta cantidad (200-300,000 UFC) es beneficioso. Este hecho es confirmado por fuentes recientes, como Cheng et al. en 2023, quienes enfatizan que la cantidad de inoculantes es un factor importante que afecta la calidad de la fermentación del ensilado, se necesita al menos 10^5 UFC/g de bacterias ácido lácticas para asegurar una mejora significativa en la calidad del ensilado, sin embargo, la cantidad de inoculante debe formularse para lograr una calidad de fermentación óptima para diferentes especies de plantas de ensilaje.

Teóricamente, cuando los inoculantes se aplican en forma seca o líquida a forrajes marchitos hasta aproximadamente 30 a 50% de MS, la eficacia del mismo producto debería ser igual, pero hay pocos datos publicados que respalden esta afirmación. Sin embargo, cuando la humedad limita la actividad microbiana ($> 50\%$ de MS), los inóculos aplicados en un líquido pueden ser más ventajosos ya que las bacterias se agregan con su propia humedad para ayudar a acelerar la fermentación. El almacenamiento es un aspecto importante de un inóculo de alta calidad que contenga microorganismos vivos. Los inóculos deben conservarse en áreas frescas y secas, lejos de la luz solar directa. La humedad, el oxígeno y la luz solar disminuirán la estabilidad de los inóculos y una vez expuesto al aire el inóculo, debe usarse lo más pronto posible (Kung, 2014).

El número de estudios sobre la selección y el efecto de la adición de nuevas cepas bacterianas para su uso como inoculantes de ensilaje ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, el potencial biotecnológico de las bacterias ácido lácticas involucradas en la fermentación del ensilaje sigue siendo poco explorado (Carvalho *et al.*, 2021).

Otros criterios para la selección de inoculantes incluyen el hábitat natural de las plantas, el rápido crecimiento de la biomasa vegetal cortada o picada, la insensibilidad a los bacteriófagos, la compatibilidad con cocultivos, la estabilidad genética, la tolerancia al estrés y la inhibición de mohos y levaduras. Además, el entorno de ensilado y la capacidad de las BAL para adaptarse y metabolizar

rápidamente los nutrientes disponibles son fundamentales para la fermentación de la biomasa vegetal (Okoye *et al.*, 2023). Algunos de los grandes retos al seleccionar las cepas BAL más eficientes son: optimizar las condiciones de fermentación y mejorar la eficiencia de la fermentación, se puede mejorar aún más la calidad y rendimiento del ensilado de ácido láctico. Esto garantizará una fuente de alimento más estable y confiable para la cría de animales, promoviendo así su desarrollo sostenible (Zhao *et al.*, 2024).

3.5 Inoculación epífita y exógena

La inoculación con bacterias ácido lácticas es una herramienta clave para optimizar procesos fermentativos en la agricultura y ganadería. Estas bacterias pueden clasificarse en dos tipos principales: las epífitas, que se encuentran naturalmente en el material vegetal, y las exógenas, introducidas deliberadamente para garantizar una fermentación más controlada y efectiva (Kung, 2014).

El material vegetal destinado al ensilado tiene una variedad de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos en su superficie, denominados microflora epífita. Su composición depende del tipo de materia prima y de los factores ambientales (clima durante la cosecha, agrotecnia y tecnología de recolección). La microflora epífita determina en gran medida la fermentación del material ensilado a través de la cantidad y el tipo de ácidos orgánicos producidos, al mismo tiempo que afecta la estabilidad del ensilado obtenido. Los grupos individuales de microorganismos que existen en las plantas tienen diferentes requisitos en cuanto a la temperatura y la actividad del agua y difieren en la posibilidad de utilizar compuestos orgánicos; las BAL del género *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. curvatus*, *L. gasseri*, *L. pentosus*) y del género *Pediococcus* (*P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. confusa*) no superan 1×10^3 UFC/g (Fabiszewska *et al.*, 2019).

La mayoría de las cepas de bacterias ácido lácticas están presentes de forma natural en el ensilado fermentado espontáneamente; Por lo tanto, se han aislado,

cultivado y utilizado como inoculantes de cepa única o mixta para garantizar una fermentación controlada del ensilado (Jatkauskas *et al.*, 2025). La inoculación de bacterias ácido lácticas epífitas en ensilados presentan mejor eficacia que una cepa exógena y dos razones lo explican, la primera son las diferencias en la preferencia de las diferentes especies de BAL para la utilización de carbohidratos de diversas materias primas, mientras que la segunda es, las BAL de la misma especie exhibieron preferencias adaptativas que fueron moldeadas por su entorno de vida, los tipos de carbohidratos disponibles en varias materias primas y metabolitos. Igual bien, las cepas experimentan una evolución genética influenciada por el medio ambiente, lo que lleva a la aparición de genotipos únicos, que confieren fenotipos y funciones fisiológicas distintas a estas cepas (Kung, 2014).

En comparación con las BAL exógenas, las BAL epífitas tienen una mayor capacidad de crecimiento y producción de ácido durante la fermentación, lo que causa una reducción más rápida del pH y una capacidad de consumo de carbohidratos más significativa. Además, la fermentación de las BAL epífitas da lugar a niveles más altos de ácido ascórbico, glutatión y actividad antioxidante total, lo que puede prolongar la vida útil (Kung, 2014). Existe un excelente potencial biotecnológico en la microbiota epífita implicada en la fermentación del ensilado. La diversidad metabólica de estos microorganismos amplía las posibilidades de selección de nuevos inoculantes, siempre que esta selección sea rigurosa y precisa para garantizar que el resultado sea fiable y satisfaga las necesidades de la producción agrícola actual y futura (Carvalho *et al.*, 2021).

Se han aplicado inoculantes exógenos de BAL a los forrajes para alterar el patrón de fermentación con el fin de producir un ensilado con características deseables. El trasplante de microbiota beneficiosa de donantes sanos a receptores que carecen de una microbiota beneficiosa específica es una práctica médica común, con la misma actividad funcional en el receptor que en el donante (Draper *et al.*, 2018). También es factible trasplantar microbiota epífita entre forrajes con diferentes composiciones y características microbianas para mejorar la calidad del ensilado (Nazar *et al.*, 2020).

Los inoculantes bacterianos se producen mediante el cultivo de cepas bacterianas de acuerdo con las condiciones óptimas de crecimiento, y la biomasa se seca por liofilización. La preparación se administra a las plantas después de la cosecha mediante pulverización con una suspensión acuosa de bacterias, utilizada en una dosis que proporciona el número de células bacterianas destinadas al ensilado, que es un mínimo de 1×10^5 UFC/g de material vegetal (Jatkauskas *et al.*, 2025).

Sin embargo, con el desarrollo continuo de la tecnología y los cambios continuos en el mercado, la fermentación del ensilado de ácido láctico también enfrenta algunos desafíos y áreas para una mayor investigación. Los procesos y la tecnología de fermentación del ensilado con ácido láctico aún deben mejorarse y optimizarse. Todavía se necesita más investigación sobre cómo cribar cepas de bacterias lácticas más eficientes en diferentes entornos, así como cómo controlar factores como la temperatura, la humedad y el contenido de oxígeno en el proceso de fermentación para lograr el mejor efecto de fermentación (Zhao *et al.*, 2024). La futura innovación tecnológica en la fermentación del ensilado debería destacar el desarrollo de aditivos nuevos, eficientes y respetuosos con el medio ambiente (Zhao *et al.*, 2024).

Los agaves se desarrollan en un microbioma complejo en donde suelen involucrarse algunas interacciones benéficas entre la planta con los microorganismos con los que coexisten, dichas relaciones pueden desarrollarse desde las bacterias y otros organismos que habitan en el suelo hasta las bacterias que residen dentro de la planta, las cuales se denominan endófitas y suelen desarrollarse dentro de sus tejidos, donde establecen una relación simbiótica, otorgándole beneficios a la planta como el potencial para fijar nitrógeno, reducir niveles de etileno, la producción de compuestos antimicrobianos y promotores de crecimiento (Silva-López *et al.*, 2025).

En este trabajo de investigación se evalúan tanto una cepa epífita como una cepa exógena de bacterias ácido lácticas para optimizar procesos fermentativos en ensilado de *A. salmiana*. A continuación, se describe específicamente la producción del inóculo a partir de la cepa epífita, destacando los pasos y condiciones necesarias para su producción y posterior aplicación.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los efectos de la adición de dos aditivos microbiológicos: inóculo microbiológico comercial (Biosile®: *Lactobacillus Plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*) y uno nativo (*Lactobacillus pantheris*) sobre la dinámica microbiológica y fisicoquímica del ensilado de *Agave salmiana* a través del tiempo mediante cinéticas microbianas, la cuantificación de pH, materia seca, lactato, pérdida de materia seca, azúcares reductores, oxalatos y saponinas.

Objetivos específicos

1. Reactivar la cepa nativa *Lactobacillus pantheris* (CM4) para la producción de inóculo nativo.
2. Comparar los efectos de los aditivos microbiológicos comercial y nativo sobre las cinéticas microbiológicas de bacterias ácido lácticas, mesófilos y levaduras del proceso de ensilado a lo largo de 720 horas de fermentación.
3. Desarrollar y validar preliminarmente protocolos analíticos para la determinación de pH, azúcares reductores, saponinas, oxalatos y producción de lactato en el ensilado de *Agave salmiana*, evaluando la aplicabilidad de métodos reportados en otras especies y en matrices alimentarias, con el fin de monitorear cambios a lo largo del tiempo.

Hipótesis

Hipótesis nula

La adición de inóculos microbiológicos (nativo y comercial) al ensilado de *A. salmiana*, no tendrá diferencias respecto a las cinéticas microbiológicas o sobre la

pérdida de materia orgánica, el pH, los azúcares reductores, las saponinas, los oxalatos y producción de lactato, respecto a un ensilado sin aditivos.

Hipótesis alternativa

La adición de inóculos microbiológicos (nativo y comercial) al ensilado de *A. salmiana*, modificará las cinéticas microbiológicas acelerando el proceso de fermentación con una reducción en la pérdida de materia orgánica, un menor pH, un consumo más rápido de los azúcares reductores, un menor contenido de saponinas y oxalatos, así como una mayor producción de lactato, respecto a un ensilado sin aditivos.

Pregunta de investigación

¿Cómo influye la adición de inóculos microbiológicos la fermentación del ensilado de *Agave salmiana*?

Justificación

En las zonas áridas y semiáridas de México, *Agave* spp., representa una fuente importante de nutrientes, especialmente por su capacidad de proveer agua y biomasa tanto para consumo humano como para la alimentación animal. Estas plantas, están ampliamente distribuidas y adaptadas a condiciones ambientales extremas, lo que las convierte en un recurso estratégico para la producción agrícola en regiones con escasez de agua. En especial, el *Agave salmiana*, una planta no cultivada, contiene un alto contenido de azúcares, tradicionalmente empleada en la producción de bebidas alcohólicas mexicanas (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008).

Durante la estación seca (octubre – marzo) las hojas de *A. salmiana* se utilizan como alimento para ganado vacuno y caprino. Sin embargo, las plantas jóvenes presentan

un alto contenido de compuestos como cristales de oxalato de calcio, aceites acres y saponinas (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008). La madurez de la planta reduce parcialmente estos compuestos, pero no elimina la necesidad de un tratamiento previo al consumo para mejorar su digestibilidad y calidad nutricional.

El ensilado se ha propuesto como una alternativa eficaz para la conservación del material vegetal, ya que reduce la presencia de compuestos antinutricionales y mejora la calidad del material vegetal. El guishe de agave, obtenido por el raspado de las hojas, ha demostrado ser un material viable para este proceso. No obstante, existe controversia respecto a la necesidad de inocular el material con cultivos iniciadores, ya que se presume que la fermentación del agave es predominantemente homoláctica. Por ello, resulta importante evaluar la eficiencia del proceso de ensilado con bacterias ácido lácticas, al fin de determinar su impacto en la reducción de antinutrientes y la mejora de la calidad final del ensilado.

I. Producción de inóculos de *Lactobacillus pantheris*

Este capítulo comprende los métodos y técnicas utilizadas a nivel laboratorio para la producción del inóculo de *Lactobacillus pantheris* (CM4) una cepa nativa aislada de ensilados finales de *Agave salmiana*. Del mismo modo, se expone el método usado para la reactivación de la cepa, incluyendo condiciones de cultivo, los medios utilizados y preservación previa a su uso, así como los resultados obtenidos durante la producción. Se abordan, de la misma manera, conceptos teóricos que contribuyan a la comprensión del capítulo.

Materiales y métodos

Para la reactivación de la cepa CM4 (*L. pantheris*) aislada de ensilados de *A. salmiana* y crio conservada en glicerol a -80°C , se inocularon 50 ml de caldo de cultivo DeMan, Rogosa y Sharpe (MRS-Milipore Merck Sigma). El cultivo se incubó por 16 horas a 37°C con agitación de 100 rpm. Por otro lado, se construyó un cepario, donde 500 μl de glicerol al 50% y 500 μl de caldo MRS con la cepa se colocaron en un crio-tubo y se almacenaron en congelación a -80°C , para futuros usos en los próximos años.

Posterior a la reactivación, se realizó un cultivo en serie axénico, para ello se sembró la cepa CM4 en placas de agar MRS, inoculando por estría hasta obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron a 37°C por 16 horas. Se seleccionaron colonias aisladas de las placas y se sembraron en 200 ml de caldo MRS, previamente esterilizado, en un matraz Erlenmeyer. Esta operación se realizó por triplicado y los cultivos se incubaron a 37°C por 16 horas a 100 rpm.

Tras la incubación, se determinó el número de células contenidas por mililitro de medio utilizando una cámara de Neubauer. Para lo cual, se diluyeron los cultivos en solución salina tamponada con fosfato (PBS, preparación en el **anexo**), realizando diluciones seriadas hasta 10^{-6} , se tomaron 10 μl de la disolución 10^{-2} del caldo de cultivo con PBS y se colocaron en la cámara superior e inferior para tener un

duplicado de los datos. Se realizó el conteo en el cuadrante central de la cámara con la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{\text{Células}}{\text{ml}} \right] = \frac{(\# \text{ células}) (\text{Factor de multiplicación específico de la cámara}) (\text{Factor de dilución})}{\# \text{ cuadros usados}}$$

Posteriormente, se seleccionó una de las tres muestras de caldo MRS para usarse como aditivo microbiológico, para ello, se buscó llegar a una concentración final de 1×10^5 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en un volumen final de 500 ml diluido en una solución con PBS; inicialmente de la muestra se tenía una concentración de 391 000 UFC/ml, por ello, se utilizó la fórmula $C_i * V_i = C_f * V_f$; donde: C_i es la concentración inicial de muestra, V_i es el volumen inicial de la muestra, C_f es la concentración final, y V_f es el volumen final que se desea obtener; esto con la finalidad de determinar el volumen que había que añadir de cultivo para poder obtener la concentración final de bacterias deseadas. Así que, la disolución de PBS y caldo de cultivo fue de 371 ml y 129 ml respectivamente. Esta disolución fue centrifugada a 4°C por 5 min y 6000 xg. El sobrenadante se desechó y el pellet fue conservado en ultra congelación a - 80°C.

Análisis estadísticos descriptivos

Para los análisis estadísticos se usó el software Excel de Microsoft 2019, en él se introdujeron los datos del conteo de la cámara de Neubauer, y se estimó el promedio de las UFC por muestra, así como la desviación estándar para la dispersión de los datos y el porcentaje de error. De estos datos se obtuvo un gráfico de barras en el que se contrastó el total de log UFC de cada repetición y las barras de desviación estándar. Además, se realizó un análisis de varianza con un modelo de ANOVA general con un 95% de confianza, en el cual se hizo una comparación múltiple de medias con una prueba post hoc de Tuckey.

Resultados y discusiones

En el análisis estadístico de ANOVA, los resultados revelaron que existen diferencias significativas entre las muestras evaluadas ($p=0.007$). Para identificar entre qué grupos existen diferencias significativas, se aplicó la prueba post hoc de Tuckey, la cual indica que la muestra C es significativamente mayor comparada con la muestra B, mientras que la muestra A ocupa una posición intermedia que no difiere de manera significativa de ninguna (**anexo: tabla 11 y 12**)

Como se observa en el **gráfico 1**, la muestra C presentó el mayor número de UFC en logaritmo, con un promedio cercano a 5.75, mientras que la muestra B mostró el menor conteo, alrededor de 5.45. La muestra A, utilizada para fines del experimento, presentó un promedio intermedio de aproximadamente 5.6 log UFC. Las barras de error indican que la dispersión de los datos fue más alta en la muestra C, lo cual sugiere una mayor variabilidad en los resultados obtenidos para esta muestra en comparación con las otras dos. Esta variabilidad podría estar relacionada con factores intrínsecos o con el proceso de reactivación de la cepa.

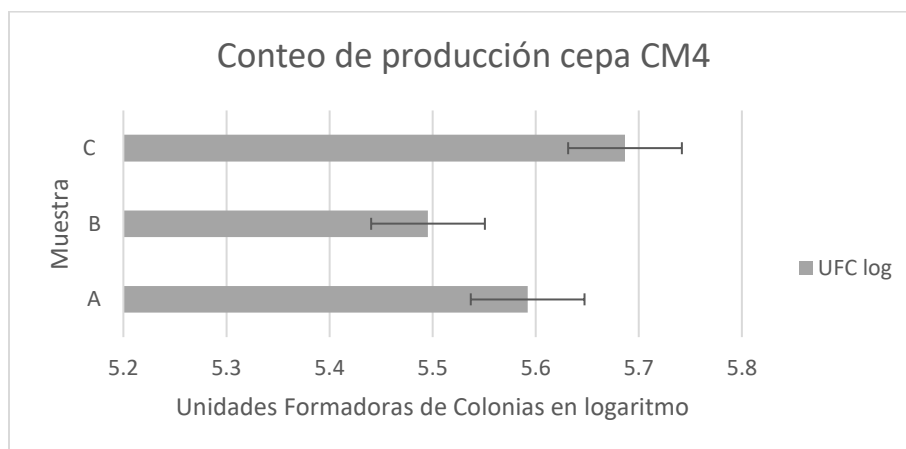


Gráfico 1: Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función de logaritmo. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

Esta posición intermedia de la muestra A, sugiere un comportamiento microbiológico estable, que no se distingue significativamente por un mayor o menor crecimiento frente a las otras condiciones evaluadas. Por lo tanto, la muestra A representa una opción con resultados consistentes dentro del rango comparado, aunque no sobresaliente en términos de eficacia o disminución microbiana.

II. Ensilado: proceso y análisis de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos

Este capítulo describe el proceso de ensilado de guishe de *A. salmiana* en un entorno controlado de laboratorio. Donde se llevaron a cabo cinéticas microbiológicas para monitorear el desarrollo de microorganismos involucrados en el proceso de fermentación. Además, se realizaron mediciones periódicas de varios parámetros clave, tales como el pH, pérdida de materia orgánica por liberación de CO₂, concentración de saponinas, azúcares reductores y la acumulación de ácido láctico. Estos análisis permitieron evaluar la eficiencia del ensilado y la calidad del producto final.

Objetivos

Comparar los efectos de los aditivos microbiológicos comercial y nativo sobre las cinéticas microbiológicas de bacterias ácido lácticas, mesófilos y levaduras del proceso de ensilado a lo largo de 720 horas de fermentación.

Desarrollar y validar preliminarmente protocolos analíticos para la determinación de pH, azúcares reductores, saponinas, oxalatos y producción de lactato en el ensilado de *Agave salmiana*, evaluando la aplicabilidad de métodos reportados en otras especies y en matrices alimentarias, con el fin de monitorear cambios a lo largo del tiempo.

Materiales y métodos

Se evaluó el efecto de dos aditivos microbiológicos (cepa de *Lactobacillus*, nativa del ensilado de *A. salmiana*: *Lactobacillus pantheris* (CM4) y un aditivo comercial: Biosile®: *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*) sobre el ensilado de *A. salmiana*. Para tal efecto, se prepararon tres grupos experimentales: control negativo (ensilado de *A. salmiana* sin tratamiento), control positivo (ensilado de *A.*

salmiana inoculado con aditivo microbiológico comercial Biosile®) y un tratamiento (ensilado de *A. salmiana* inoculado con una cepa nativa CM4).

Preparación del ensilado

Se colectaron y desfibraron pencas de *A. salmiana* en el Distrito de Educación, Salud, Ciencia, Tecnología e Innovación (DESCTI, 20.113, -98.828) durante febrero de 2024, para obtener 6 kg \pm 500 g de guishe. El material desfibrado se ensiló en bolsas de poliamida y polietileno, que fueron selladas al vacío, para asegurar la anaerobiosis del ensilado, e incubadas a 30°C durante 30 días.

Preparación de los aditivos microbiológicos

El inóculo comercial se preparó en base en las instrucciones proporcionadas por el fabricante de Biosile® para forrajes húmedos. Para ello, se diluyeron 0.3 g de Biosile en 24 ml de agua purificada y hervida, esto para eliminar las bacterias contenidas en el agua y evaporar el cloro, al finalizar se llevó a un volumen final de 200 ml con PBS a una concentración final de 2×10^5 UFC/g. De manera similar, el inóculo de la cepa nativa CM4 se diluyó con 24 ml de agua purificada y hervida, se aforó a 200 ml con PBS a una concentración final de 1×10^5 UFC/g. Posteriormente, las diluciones fueron añadidas a la pulpa de agave y mezcladas vigorosamente.

Recolección de muestras

Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en esta investigación fue un diseño factorial completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial. Se evaluaron tres tratamientos: una cepa nativa de bacteria ácido láctica (CM4), una combinación de cepas comercial (Biosile®) y un grupo de control (sin aditivos). Cada tratamiento se

sometió a cinco tiempos de fermentación estandarizados (0 h, 32 h, 72 h, 168 h y 720 h), a 30°C, los cuales fueron los mismos para todos los tratamientos, manteniendo condiciones homogéneas de temperatura durante el proceso de ensilado.

Para cada tratamiento, incluido el control, se prepararon 15 bolsas de material vegetal ensilado. En cada uno de los cinco tiempos de muestreo predefinido, se seleccionaron tres bolsas por grupo experimental, lo que permitió obtener una representación adecuada de la variabilidad dentro de cada grupo. En total el experimento contó con 45 bolsas de poliamida y polietileno (15 para cada grupo – Control negativo, control positivo y tratamiento 1). Cada bolsa contenía un peso final de 140 g \pm 5 g de material. Esta metodología asegura una distribución aleatoria de las unidades experimentales, reduciendo el sesgo y aumentando la validez de los resultados.

Las variables de respuesta evaluadas, incluyen parámetros microbiológicos y fisicoquímicos, como: materia seca, pH, pérdida de materia orgánica por liberación de CO₂, concentración de azúcares reductores, saponinas, L-lactato y oxalatos. El diseño permitió analizar tanto el efecto individual de cada tratamiento como la interacción entre el tipo de cepa y el tiempo de fermentación sobre las características del ensilado.

Luego de la recolección de cada uno de los cinco tiempos estandarizados (0 h, 32 h, 72 h, 168 h y 720 h), las bolsas fueron congeladas a -20°C hasta su próximo uso en los siguientes análisis.

Aislamiento e identificación de microorganismos

Para tener una comprensión más clara de la dinámica microbiana en el ensilado y confirmar que las cepas añadidas sobreviven y crecen según lo esperado, se realizó aislamiento e identificación de microorganismos en los diferentes tiempos de ensilado (0 h, 32 h, 72 h, 168 h y 720 h), también se hizo con la finalidad de detectar

microorganismos indeseables como levaduras, mohos o bacterias patógenas que causan deterioro en el proceso y bajan la calidad nutricional.

Para desprender a los microorganismos presentes en el material ensilado, se llevó a cabo una dilución 1:10 de 10 g de muestra fresca de ensilado de cada uno de los tiempos (0 h, 32 h, 72 h, 168 h y 720 h) y 90 ml de agua peptonada al 0.01% de tween 20 en matraz Erlenmeyer de 250 ml, esto por cada muestra. Los matraces se llevaron a incubación a 26°C/ 1 h a 260 rpm; luego, el contenido se filtró con gasa de dos capas en condiciones de esterilidad. Del líquido filtrado, se tomó 1 ml y se hicieron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-12} sembrando las diluciones por triplicado en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA) 30 μ l y Agar Bilis Rojo Violeta (VRBA) 10 μ l.

Las placas se incubaron a 30 °C por 24 horas. Pasado este tiempo, se realizó un conteo de colonias.

Análisis de parámetros fisicoquímicos

Para evaluar la calidad y características del ensilado, se midieron parámetros importantes que pudieran dar información relevante del proceso de fermentación, como lo son: pérdida de materia orgánica por CO₂, Materia Seca (MS), pH, Azúcares reductores, L-lactato, saponinas y oxalatos.

Pérdida de materia orgánica por liberación de CO₂

Para determinar esta pérdida durante el proceso de ensilado, se pesaron las bolsas de los tiempos iniciales y finales de ensilado, pertenecientes a cada uno de los tratamientos, de estos datos, se realizó una diferencia aritmética y se calculó el porcentaje de pérdida de materia orgánica, asumiendo que la disminución en peso se debía principalmente a la liberación de dióxido de carbono (CO₂).

$$\text{Pérdida de materia orgánica por liberación de CO}_2 = \text{Peso inicial del ensilado} - \text{Peso final del ensilado}$$

Materia seca

Para la determinación de materia seca en el ensilado de *A. salmiana*, se tomó una muestra representativa de 10 ± 1 g de ensilado fresco y se colocaron en una charola previamente tarada. La muestra se secó en una estufa de secado a 65°C hasta alcanzar un peso constante (aproximadamente 16.5 h). Posteriormente, se pesó la muestra y se calculó el porcentaje de materia seca usando la fórmula:

$$\% MS = \frac{\text{Peso seco (g)}}{\text{Peso fresco (g)}} \times 100$$

Este método permitió cuantificar la fracción sólida libre de agua del ensilado y cada uno de los tratamientos. Existen diversas metodologías usadas para calcular la pérdida total de materia seca, en Ramos *et al.*, 2021 consideran la de Schmidt 2006, quien propone calcularla por la diferencia entre los pesos brutos de materia seca inicial y final del silo. Por lo tanto, la base para cuantificar la pérdida de MS en el proceso de ensilado se produce por diferencias de pesos.

Azúcares reductores

Para la medición de azúcares reductores, 5 g de ensilado fresco fueron diluidos en 45 g de agua desmineralizada, en una proporción 1:10; posteriormente se licuó hasta obtener una mezcla uniforme y se filtró en un embudo con gasa de doble capa, el filtrado se congeló a -20°C hasta su uso.

Para la determinación de estos azúcares, se utilizó el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) tal como describe McCleary *et al.*, (2018; 2020)

La **curva de calibración** consistió en preparar soluciones estándar de glucosa con concentraciones conocidas que van desde 0.0 a 1.0 mg/ml (**tabla 3**).

Tabla 3*Preparación de la curva estándar de calibración de azúcares reductores*

Número de estándar	Volumen de stock glucosa 0.2% (µl)	Volumen de agua (µl)
Blanco	0	1000
1	25	975
2	50	950
3	100	900
4	200	800
5	300	700
6	400	600
7	500	500
8	1000	0

Nota. Las soluciones patrón se elaboraron a partir de una disolución madre de glucosa al 0.2 % (p/v). Para cada estándar, los volúmenes de glucosa y agua desionizada se combinaron hasta un volumen final de 1 000 µL.

De cada solución estándar y blanco, se usaron 200 µl y se le añadió una cantidad fija de DNSa (100 µl), siguiendo el protocolo, las muestras se pusieron en ebullición a 100°C por 15 minutos. Pasado este tiempo, las muestras se enfriaron en un baño de hielo y se les agregaron 900 µl de agua destilada para ser mezcladas en vortex por 10 segundos, hecho esto, se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX.

Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron contra las concentraciones de glucosa estándar.

Para la determinación de azúcares reductores en las muestras de ensilado, se usaron 200 µl de muestra filtrada, a la muestra se le agregaron 100 µl de solución reactiva de DNSA y se llevó a ebullición a 100°C por 15 minutos. Luego, se enfriaron las muestras en un baño de hielo y se les agregó 900 µl de agua destilada, esto se mezcló en vortex por 10 segundos y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX.

pH

Para la medición de este parámetro, 5 g de ensilado fresco fueron diluidos en 45 g de agua desmineralizada, en una proporción 1:10; posteriormente se licuó hasta obtener una mezcla uniforme y se filtró en un embudo con gasa de doble capa. El pH de la muestra filtrada inmediatamente fue medido en un potenciómetro OAKTON pH 700 pH/mV/°C/°F. Calibrado con buffer 7, 4 y 1.68.

L-lactato

Para la cuantificación de L-lactato, 5 g de ensilado fresco fueron diluidos en 45 g de agua desmineralizada, en una proporción 1:10; posteriormente se licuó hasta obtener una mezcla uniforme y se filtró en un embudo con gasa de doble capa. Posteriormente, 1 ml de muestra, filtrada fue centrifugado a 10000 rpm durante dos minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante resultante fue recuperado para la medición de lactato.

La concentración de lactato fue determinada utilizando un analizador bioquímico YSI 2700 select, el equipo fue previamente calibrado utilizando estándar YSI 2747, que contenía D-Glucosa [1.80 g/l], L-Lactato [0.45 g/l]. La medición se realizó siguiendo el protocolo establecido por el fabricante del analizador.

Saponinas

Para la cuantificación de saponinas, se utilizó el método colorimétrico propuesto por Hiai en 1976, quien propone el uso de vainillina y H₂SO₄ para la generación de grupos cromóforos en saponinas.

La preparación de la curva de calibración se realizó conforme lo indicado en la **tabla 4**:

Tabla 4

Preparación de curva estándar de calibración para cuantificación de saponinas

Número de estándar	Saponina (µg)	Estándar de saponina (ml)	Metanol 80% (ml)	Reactivo de vainillina (ml)	Ácido sulfúrico 72% (ml)
Blanco	0	1000	0.25	0.25	2.5
1	25	975	0.20	0.25	2.5
2	50	950	0.15	0.25	2.5
3	100	900	0.10	0.25	2.5
4	200	800	0.05	0.25	2.5
5	300	700	0.00	0.25	2.5

Nota. Los volúmenes de estándar de saponina, metanol 80 %, reactivo de vainillina y ácido sulfúrico 72 % están expresados en mililitros y se combinan para cada estándar, dando el volumen total de reacción por punto de la curva.

El estándar de saponina se añadió a un tubo de ensayo, posteriormente se agregó el metanol al 80% a temperatura ambiente. Los tubos se transfirieron a un baño de hielo, ahí se adicionaron 0.25 ml vainillina y 2.5 ml de ácido sulfúrico al 72%, mezclando vigorosamente en vortex hasta unificar el contenido. La mezcla se calentó en un baño María a 60°C durante 10 minutos. Tras el calentamiento, los

tubos se enfriaron en un baño de hielo y se volvieron a mezclar en vortex para asegurar la homogeneidad de la muestra. Finalmente, se midió la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro.

Para la cuantificación de saponinas, las muestras del ensilado fresco se secaron en una estufa de secado a 65 °C sobre charolas de aluminio hasta alcanzar una humedad final de 6-8%. Las muestras de ensilado ya secas, se molieron en mortero y tamizaron hasta alcanzar un tamaño ≤ 1 mm de partícula, este fue almacenado en desecador hasta su próximo uso.

Para la extracción de saponinas de la matriz ensilada, se pesaron 250 mg de muestra de ensilado seco y se colocaron en tubos falcón de 50 ml, luego, a cada tubo se le añadieron 10 ml de metanol acuoso al 80% y las muestras se agitaron inmediatamente para asegurar una mezcla homogénea. Los tubos se mantuvieron en agitación mecánica en un agitador orbital durante 16 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante, que contenía el extracto de saponinas, se recolectó en tubos falcón de 50 ml. A los tubos con remanente de muestra, se le adicionaron 10 ml de metanol al 80%, y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se recolectó nuevamente el sobrenadante adicional.

En un tubo de cultivo, se añadieron 200 μ l de extracto de saponinas, para luego agregar 50 μ l de metanol al 80% a temperatura ambiente. Los tubos se transfirieron a un baño de hielo, ahí se adicionaron 0.25 ml de vainillina y 2.5 ml de ácido sulfúrico al 72%, las muestras se mezclaron vigorosamente en vortex, después pasaron a un baño María para calentarse a 60°C por 10 minutos. Luego de este periodo se enfriaron los tubos en un baño de hielo. Finalmente, se midió la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro. Los valores de absorbancia se graficaron contra las concentraciones de saponina estándar.

Oxalatos

Para llevar a cabo la determinación de oxalatos en el ensilado de *A. salmiana*, se utilizó la técnica de titulación descrita por Mishra *et al.*, 2017, en la cual 10 ±1 g de ensilado fresco, se secaron en una estufa de secado a 65°C hasta alcanzar un peso constante (16.5 h). Las muestras se molieron y tamizaron hasta alcanzar un tamaño de partícula de 1 mm, estas fueron resguardadas en un desecador libre de humedad hasta su próximo uso en el análisis.

La determinación se realizó mediante un método de titulación. Se pesó 1 g de material vegetal y se transfirió a 30 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 N, esto se hirvió a baño María durante 15 minutos. A continuación, el extracto fue filtrado con papel filtro Whatman No. 1 y se le añadió agua desionizada en igual proporción, de este extracto filtrado, se tomaron 10 ml y se le añadieron 40 ml de H₂SO₄ 0,5 N.

50 ml finales de la mezcla, se calentaron a 60°C y se valoró contra una solución 0,005 N de permanganato de potasio (KMnO₄). El punto final se determinó mediante el aspecto de color rosa claro en la muestra del extracto.

Resultados y discusiones

Cinéticas de crecimiento microbiano

Los resultados del seguimiento de microorganismos patógenos en el ensilado, indican una rápida disminución o nula presencia de estos (Coliformes fermentadores de lactosa y levaduras), probablemente debido a las condiciones anaerobias y la acidificación del medio, lo cual es consistente con la eficacia del proceso de ensilado en inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. La **tabla 5** muestra la cinética de crecimiento de coliformes fermentadores de lactosa, microorganismo que es detectable solamente en el tiempo cero, sin embargo, después de la hora 32 no es detectable hasta una vez finalizado el proceso de

fermentación, en el **gráfico 1** se ve este crecimiento a lo largo del proceso de ensilado (720 horas).

Tabla 5

Cinética de crecimiento de coliformes fermentadores de lactosa en ensilado de A. salmiana.

Tiempo (h)	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
0	4.687 ± 1.325	3.845 ± 0.594	4.091 ± 1.064
32	0	0	0
72	0	0	0
168	0	0	0
720	0	0	0

Nota. Técnica de sembrado en placa de Agar Violeta Rojo Bilis (AVRB), datos de la media expresados en log UFC.

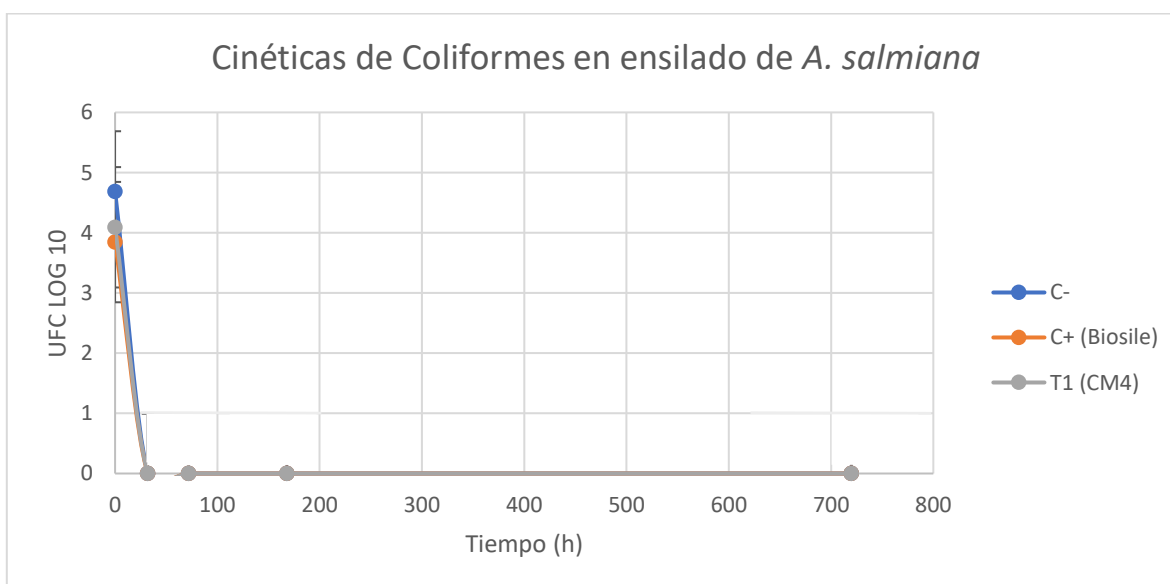


Gráfico 1: Crecimiento y cinética de coliformes en el ensilado de *A. salmiana*, los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n=3).

A partir de las 32 horas de fermentación, las poblaciones de microorganismos se mantuvieron por debajo del límite de detección ($< 1 \text{ Log}_{10} \frac{\text{UFC}}{\text{g}}$), por lo que no se reporta desviación estándar para esos puntos de muestreo. Esto sugiere una supresión rápida de coliformes fermentadores de lactosa durante el proceso de ensilado, hallazgo consistente con la investigación de Ruvalcaba-Gómez *et al.*, en 2019, que describe reducciones superiores a 5 log_{10} en indicadores coliformes durante la fermentación de ensilados, atribuibles a la rápida acidificación y a la actividad competitiva y antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Aunque no se descarta que la ausencia de recuentos de colonias se deba a limitaciones de la técnica de cultivo empleado para monitorear las cinéticas.

En la **tabla 6**, se muestran los resultados de la cinética de levaduras, las cuales no se detectaron en la cinética de crecimiento para ninguno de los tiempos muestreados.

Tabla 6

Cinética de crecimiento de levaduras en ensilado de A. salmiana.

Tiempo (h)	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
0	0	0	0
32	0	0	0
72	0	0	0
168	0	0	0
720	0	0	0

Nota. Técnica de sembrado en placa de Agar Papa Dextrosa (PDA) acidificado con ácido tartárico (pH 3.5), datos de la media expresados en log UFC.

Todas las determinaciones de recuento de levaduras en el ensilado de *A. salmiana*, fueron 0 log₁₀ UFC/g en cada uno de los tiempos = 0, 32, 72, 168 y 720 horas (**Tabla 6**). Las levaduras estaban en una temperatura óptima de crecimiento en el ensilado, como lo menciona Bernardes *et al.*, en 2018, quienes observaron que el rango de temperatura de las levaduras es muy variable, con un crecimiento entre 5 y 30°C, considerando que su crecimiento óptimo de la mayoría de las especies se da a 30°C. La ausencia de las levaduras cultivables en cada una de las muestras, indica que no se recuperaron células viables en las condiciones de cultivo empleadas y/o que la matriz del ensilado era inhóspita para el crecimiento de levaduras desde el inicio del experimento. Este patrón puede deberse a la eliminación real de las levaduras en la planta del ensilado, gracias a la rápida acidificación y la actividad competitiva de bacterias ácido lácticas, en 2016, González *et al.*, reporta mecanismos por parte de estas bacterias que reducen poblaciones de levaduras en ensilados bien fermentados. Además, la variabilidad epífita entre cultivos y condiciones del forraje puede resultar en recuentos iniciales bajos o indetectables, esto según Medina-Saavedra *et al.*, en sus investigaciones de 2021. No obstante, la interpretación se ve limitada por el umbral de detección del método de cultivo, por lo que no se puede distinguir entre eliminación completa ausencia por debajo del límite de detección.

Las Bacterias Ácido Lácticas se comportan de manera diferente a los otros microorganismos (coliformes y levaduras), la **tabla 7** y **gráfico 2**, nos indica como es su cinética de crecimiento en el proceso de fermentación a lo largo de 720 horas.

Tabla 7

Cinética de crecimiento de Bacterias Ácido Lácticas en ensilado de A. salmiana.

Tiempo (h)	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
0	4.8407 ± 1.607	4.0897 ± 0.420	4.1039 ± 0.514
32	6.5343 ± 1.148	14.5502 ± 1.223	14.4983 ± 1.393
72	6.2973 ± 0.071	7.9542 ± 0.673	8.1663 ± 0.150
168	5.3521 ± 0.734	13.3679 ± 0.579	SD
720	SD	SD	SD

Nota. Técnica de sembrado en placa de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), datos de la media expresados en log UFC.

SD: Sin Datos

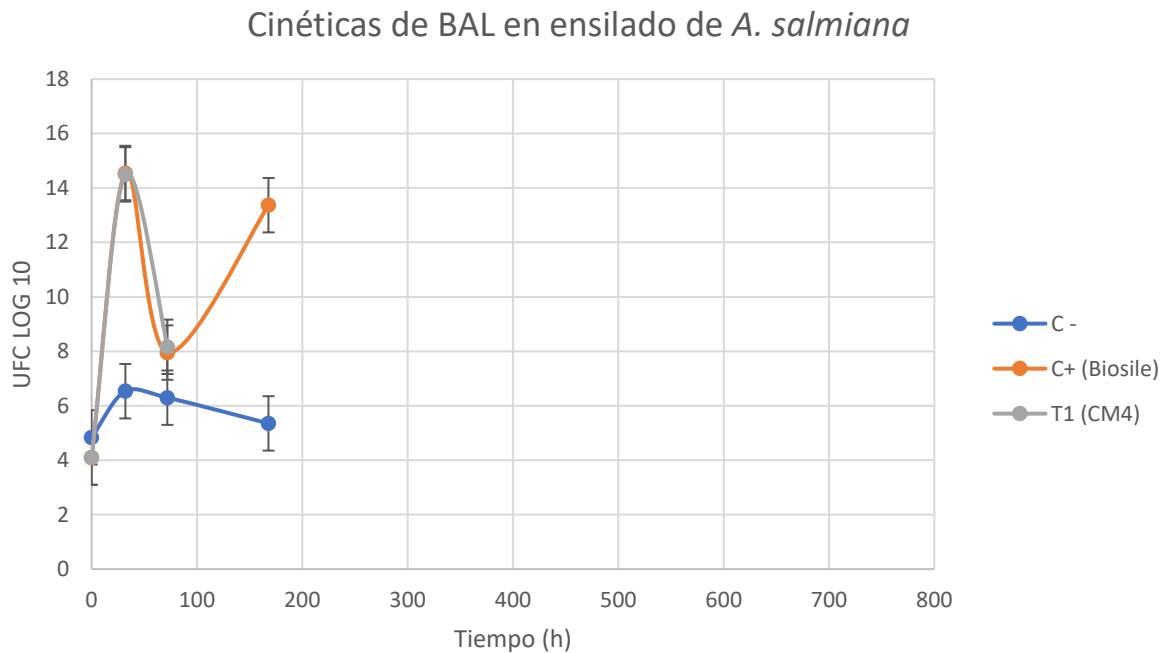


Gráfico 2: Cinética de crecimiento de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) en el ensilado de *A. salmiana*. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n=3).

Los tres grupos experimentales indican la presencia de las bacterias ácido lácticas en el ensilado a lo largo del proceso de fermentación, los aditivos exógenos (Biosile) y endógenos (CM4), aportan una ventaja competitiva en cuestión de crecimiento, respecto al grupo que tiene una fermentación espontánea (C-, sin aditivos). Esto no es concluyente para indicar qué ensilado posee mejores características y calidad final, ya que los datos de la hora 720 no se obtuvo para ninguno de los grupos experimentales, y en el caso del tratamiento 1, tampoco se obtuvo en la hora 168. Esto por patrones irrelevantes en las repeticiones del experimento.

En la investigación de Jatkauskas *et al.*, 2025, se converge en que la aplicación de un inoculante a una tasa de 10^5 UFC g^{-1} en ensilados de maíz, mejoró significativamente la calidad de la fermentación y la eficiencia de conservación del ensilado durante un período de almacenamiento de 32 días. Dejando abierta la posibilidad de seguir estudiando las cinéticas para descubrir que pasa justo en esas horas sin datos. Sun *et al.*, 2021, confirman esto, ya que en sus estudios revelaron que, de 5 a 24 h, la población de BAL tuvo una abundancia rápidamente creciente y dominó la comunidad bacteriana después de 10 h. Y tiene mucho sentido con los datos obtenidos, ya que se muestra un crecimiento exponencial en las primeras 32 horas de ensilado, pasando de 4 UFC log a 14 en los grupos que tenían aditivo Biosile y CM4. Siendo este su punto más alto en los muestreos. Aunque sea mínima la diferencia entre ambos aditivos, estudios de Nazar *et al.*, en 2020 demostraron que las BAL epífitas mejoraron en gran medida el rendimiento de la fermentación del ensilado en comparación con los aditivos comerciales de BAL en el ensilado de alfalfa. Tomando este dato como verídico, aún habría que resolver con los demás análisis, cuál tratamiento es más destacable en cuestión de calidad y rendimiento, ya que, con esta información, y por su ligera diferencia de crecimiento de las BAL entre ambos grupos de ensilado, es complicado y sería inexacto concluir.

Aunado a el diferenciador del aditivo, el perfil microbiológico del ensilado de agave varía según las etapas de fermentación y las estaciones. En el ensilado de pulpa de *A. salmiana*, las poblaciones de bacterias del ácido láctico (BAL) aumentan de 1×10^8

a 4×10^9 UFC/g durante la fermentación, superando a las bacterias mesófilas, esto en estudios de Alcantar-Morales *et al.*, en 2024. Además, esta dominancia resulta de gran influencia, ya que las BAL tienen la capacidad comprobada para controlar bacterias indeseables que son potencialmente patógenas para los animales. La aplicación de inoculantes bacterianos en el ensilado de alfalfa resultó en una reducción significativa del número total de microorganismos indeseables, incluyendo *Listeria* spp. y *Cl. perfringens*. Asimismo, el tratamiento de ensilado con las preparaciones de BAL resultó en la eliminación completa de bacterias patógenas del género *Salmonella* y *E. coli*. Los ensilados que se caracterizan por una baja contaminación clostridial, y por una baja cantidad de levadura, son aeróbicamente estables durante un período de tiempo más largo, esto según investigaciones de Fabiszewska *et al.*, en 2019.

Pérdida de materia orgánica por liberación de CO₂

En los resultados, el control positivo (Biosile) mostró la mayor pérdida de materia orgánica con 6.00 g, equivalente a un 4.243%; mientras que el control negativo registró una pérdida de 5.50 g, correspondiente al 4.056% y el tratamiento 1 (CM4) presentó la menor pérdida con un 5.53 g, representando un 3.899%. Estos resultados sugieren que el uso de aditivos como Biosile puede incrementar la pérdida de materia orgánica en el ensilado de *A. salmiana*, mientras que el tratamiento con CM4 podría ser más eficiente en la conservación de la materia orgánica comparado con los controles.

En el análisis estadístico **tabla 13** (anexo), se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) lineal, con el propósito de evaluar las diferencias entre los grupos experimentales. Se obtuvo un valor de $p = 0.036$. El valor indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos en términos de la pérdida de materia orgánica por CO₂ durante el proceso de ensilado. Aunque el ANOVA mostró diferencias globales, la prueba de Tukey indicó que solo el Control

negativo difiere significativamente del Tratamiento 1 (CM4); el control positivo (Biosile) es intermedio y no difiere significativamente de ninguno de los otros dos.

En la **tabla 8** se presenta la pérdida de materia orgánica medida a través de la emisión de CO₂ en los diferentes tratamientos, después de 720 h de ensilado. Estos resultados sugieren que el uso de la cepa nativa (CM4) como tratamiento, tiene un efecto significativo en la reducción de materia orgánica. Mostrando una pérdida global de 3.899%, estando ligeramente por debajo del control negativo (sin aditivo) que tiene una pérdida de 4.056%, mientras que el control positivo, el que contiene el aditivo de Biosile, presenta la mayor pérdida en comparación con los otros dos tratamientos (4.243%). Lo que apunta a que no es tan eficaz en comparación a los otros dos tratamientos, en la reducción de la pérdida de materia orgánica del ensilado.

Tabla 8

Pérdida de materia orgánica (MO) por liberación de CO₂ en ensilado de A. salmiana.

Tratamiento	Pérdida de MO (g)	Porcentaje (%)	Desviación estándar ±
Control negativo	5.50	4.056	1.053
Control positivo (Biosile)	6.00	4.243	0.888
Tratamiento 1 (CM4)	5.53	3.899	0.513

Nota. La pérdida de materia orgánica se determinó de forma indirecta mediante la cuantificación gravimétrica de CO₂ liberado después de 720 horas de fermentación. Los valores representan la media de tres repeticiones (n=3).

La cuantificación de este parámetro es de suma importancia para verificar el proceso de fermentación y delinear el rendimiento del mismo; estas pérdidas se pueden calcular a través de la diferencia entre los pesos de los silos, tal como lo indican Ramos *et al.*, en 2021, indican que la pérdida generada por la producción

de dióxido de carbono se debe a los gases y, es consecuencia del entorno anaeróbico y la fermentación de azúcares y ácidos orgánicos, por los microorganismos presentes en el silo, estas pérdidas pueden alcanzar del 2 al 4%, lo cual nos indica que el ensilado de *A. salmiana* se encuentra en el rango normal de esta pérdida y se asocian con todo el ambiente dentro del silo. La producción de dióxido de carbono es resultado de la respiración de la planta, que aprovecha el oxígeno residual, procedente de infiltraciones o incluso de bacterias anaeróbicas que realizan fermentaciones indeseables.

Materia seca

Los resultados (ver **gráfico 3**) obtenidos del porcentaje de materia seca indican que todos los tratamientos, incluido el control, tuvieron una disminución significativa al final de las 720 horas de ensilado a comparación con la hora 0.

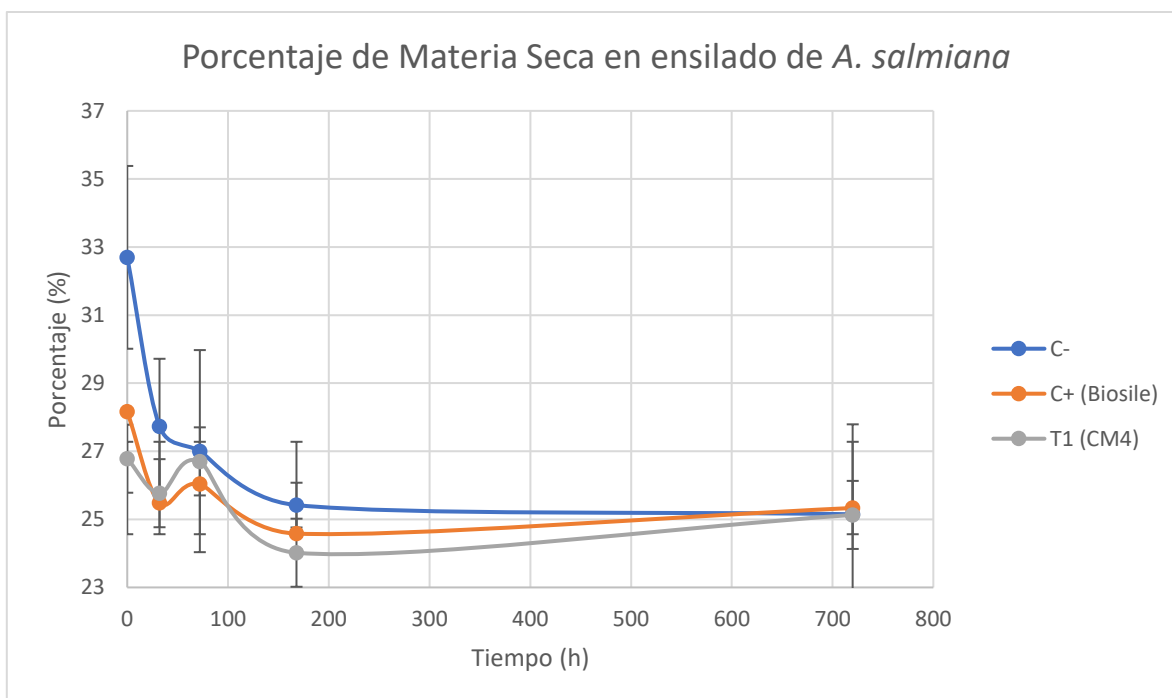


Gráfico 3: Porcentaje de materia seca a lo largo de 720 horas de ensilado de *A. salmiana*, en los distintos tratamientos. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar (n=3).

De los datos, se realizó un análisis estadístico (**Tabla 21** en anexos), indican diferencias estadísticamente significativas tanto para el tiempo transcurrido del ensilado ($p=0.000$) como el tipo de tratamiento ($p=0.012$). Mediante la prueba post hoc de parejas de Tukey (HDS) (**Tabla 23** en anexos), se exploraron las diferencias entre grupos experimentales, resultando diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo, el control positivo (Biosile) y al tratamiento 1 (CM4), asimismo los últimos dos no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellos, lo que nos indica que, si es determinante adicionar bacterias al ensilado de *A. salmiana* para reducir la pérdida de materia seca ya que, aunque parece existir una desventaja inicial entre el porcentaje de materia seca entre los distintos tratamientos, el final es el mismo para los tres grupos, quedando en 25% de MS. El control positivo (Biosile) y el tratamiento 1 (CM4) tuvieron una menor pérdida 3% y 2% al final del ensilado respectivamente, mientras que el control negativo tuvo una pérdida final de 8%, esto se muestra en la **tabla 9**.

Tabla 9

Porcentaje de materia seca en ensilado de A. salmiana.

Tiempo (h)	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
0	32.69 ± 2.68	28.16 ± 2.03	26.78 ± 1.28
32	27.73 ± 1.97	25.48 ± 2.41	25.76 ± 0.59
72	27.00 ± 2.96	26.039 ± 0.71	26.70 ± 1.05
168	25.41 ± 0.65	24.58 ± 1.15	24.01 ± 0.58
720	25.14 ± 2.64	25.33 ± 0.70	25.13 ± 0.15

Nota. Valores de materia seca expresados en %. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n=3).

Esto nos indica una menor pérdida numéricamente hablando, en los grupos de ensilado que fueron inoculados con aditivos microbiológicos (Control positivo y Tratamiento 1), y parecen reducir la pérdida de materia seca frente al control negativo; sin embargo, la convergencia en 25% de todos los grupos experimentales al final indica que, a 720 horas de proceso de ensilado, las diferencias se atenúan o que ocurrieron procesos adicionales (compactación, cambio de temperatura, manejo) que igualaron pérdidas entre tratamientos.

Este comportamiento es consistente con lo reportado por Pinos-Rodríguez *et al.* (2008), quienes señalan que la dinámica de la materia seca en el *A. salmiana* tiende a estabilizarse tras la colonización efectiva de bacterias ácido lácticas, minimizando la degradación excesiva de carbohidratos solubles. Asimismo, la reducción en la liberación de CO₂ en estos grupos coincide con los hallazgos de Zamudio *et al.* (2009), quienes postulan que el uso de aditivos microbiológicos promueve una fermentación predominantemente homoláctica. Este tipo de metabolismo optimiza la conservación de la materia seca y la energía del ensilado, en contraste con procesos heterofermentativos o clostridiales que predominan en ensilados de agave sin inocular, donde las pérdidas por descarboxilación y producción de gases son significativamente superiores.

Azúcares reductores

Los resultados (**gráfico 4**) indican que, todos los tratamientos mostraron una disminución en los azúcares reductores a lo largo del tiempo de muestreo, lo cual está directamente conectado a la disminución de pH y a la acumulación de lactato. La **tabla 10**, muestra los valores de azúcares reductores en el ensilado de *A. salmiana* durante un período de 720 horas comparando los tres tratamientos diferentes.

Tabla 10*Azúcares reductores en ensilado de A. salmiana.*

Tiempo (h)	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
0	52.619 ± 11.877	47.568 ± 7.069	64.935 ± 10.136
32	6.488 ± 1.239	6.073 ± 2.883	18.518 ± 2.251
72	2.101 ± 1.925	5.866 ± 2.106	0.869 ± 1.147
168	1.646 ± 1.237	3.385 ± 1.353	3.491 ± 1.975
720	2.207 ± 0.486	3.728 ± 0.839	7.532 ± 2.579

Nota. Valores de azúcares reductores expresados en mg/g MS. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n=3).

En el **gráfico 4** se ve una caída marcada de azúcares reductores entre las primeras 32 horas de ensilado en los tres tratamientos, seguida de un comportamiento más estable hasta las 720 h, con pequeñas variaciones experimentales. La concentración inicial (~52.619–64.935 mg/g MS) cae a valores entre 18.518-6.073 mg/g MS a las 32 h; esa reducción inicial representa 87–71% de los azúcares reductores detectables al inicio. Los valores de azúcares reductores fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA **Tabla 24** (anexo), para identificar si es que existen algunas diferencias entre los grupos experimentales del ensilado, los resultados revelan un efecto estadísticamente significativo entre las condiciones analizadas, resultando en un valor de $p < 0.05$, lo que indica diferencias significativas entre los tratamientos. Para identificar en que grupos existe diferencia o similitud, se aplicó la prueba post hoc de Tukey (**Tabla 26** - anexo), la cual indica que el tratamiento 1 (CM4) presenta una media de azúcares reductores significativamente mayor que el control negativo y es diferente a los otros dos grupos, mientras que el

control positivo (Biosile) no difiere significativamente del control negativo (Agrupación Tukey: CM4 =A; Biosile =B; Control =B).

El aditivo microbiológico CM4 conserva, en promedio, una mayor concentración de azúcares reductores que el control negativo con significancia estadística; mientras que, Biosile muestra un comportamiento intermedio sin diferencias significativas frente a ninguno de los otros dos tratamientos.

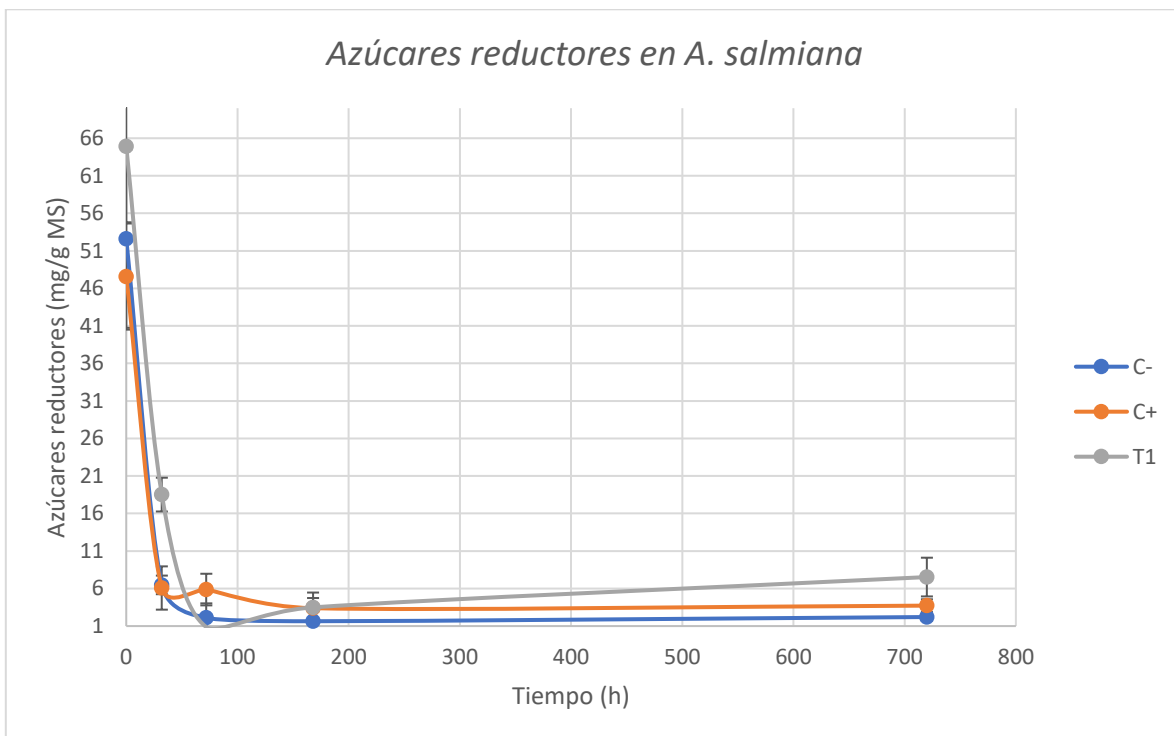


Gráfico 4: Concentración de azúcares reductores a lo largo de 720 horas de ensilado de *A. salmiana*. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar (n=3).

La caída abrupta de azúcares reductores entre 0 y 32 h se puede interpretar como la rápida utilización de carbohidratos solubles por los microorganismos presentes en el ensilado, especialmente bacterias ácido lácticas, que transforman azúcares en ácidos orgánicos durante la fase inicial de fermentación; dicho patrón coincide con la presencia de fructanos y otras fracciones solubles en *A. salmiana* que son prontamente disponibles para hidrólisis y metabolismo microbiano, por lo que la

pérdida rápida de azúcares detectada es esperable en este material vegetal, según Robles-Arias *et al.* (2024).

pH

Los resultados obtenidos en el ensilado de *A. salmiana* demuestran que la inoculación con el Tratamiento 1 (CM4) optimiza significativamente la cinética de fermentación en comparación con los controles, con una disminución total del 20.64% al finalizar el proceso (720 h), mientras que el control positivo muestra una disminución total de 17.5% y el control negativo 12.13%.

La mayor reducción de pH observada en el tratamiento 1 sugiere una mejor capacidad de acidificación, lo cual es crucial para la preservación y calidad del mismo (**gráfico 5**). En la **tabla 11** se muestran los valores de pH registrados a lo largo de un período de 720 horas para los distintos tratamientos de ensilado de *A. salmiana*.

Tabla 11

pH en ensilado de A. salmiana.

Tiempo (h)	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
0	5.113 ± 0.125	5.257 ± 0.005	5.343 ± 0.005
32	5.097 ± 0.015	4.793 ± 0.051	4.537 ± 0.015
72	5.013 ± 0.077	4.667 ± 0.015	4.380 ± 0.010
168	4.610 ± 0.020	4.530 ± 0.030	4.330 ± 0.026
720	4.493 ± 0.058	4.337 ± 0.032	4.240 ± 0.010

Nota. Valores de pH en control negativo, control positivo (Biosile) y tratamiento 1 (CM4) a lo largo de 720 horas de ensilado. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n=3).

Los datos de pH fueron sometidos al análisis estadístico ANOVA lineal (**Tabla 27** en anexo), en el cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), tanto en tiempo como en tratamiento. Se realizó un análisis post hoc (HSD) (**Tabla 29** en anexos), el cual estableció que los tres grupos de estudio tienen diferencias entre sí, ya que el valor de pH difiere en cada grupo experimental.

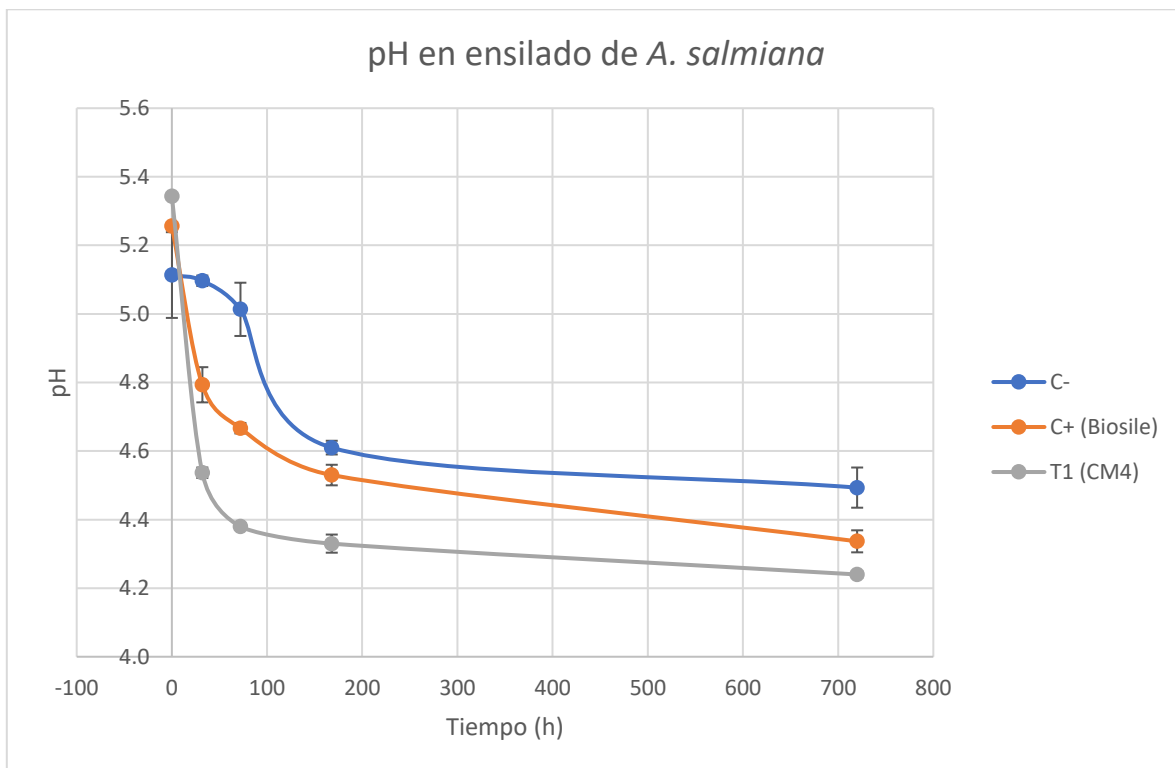


Gráfico 5: Dinámica de pH a lo largo de 720 horas de ensilado de *A. salmiana*, en los distintos tratamientos. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

Los resultados contrastan con los publicados por Pinos-Rodríguez *et al.*, en 2008 quienes registraron valores de pH de 3.58 durante la fermentación espontánea a las 720 h de ensilado de *A. salmiana*, sin ningún tipo de aditivo; mientras que otros investigadores como Alcantar-Morales *et al.*, han registrado un pH de 3.6 en el mismo tipo de ensilado en condiciones espontáneas. En la presente investigación,

el pH del ensilado espontáneo (control) resultó en 4.49, lo que puede sugerir diferencias en condiciones iniciales y de manejo (humedad inicial, contenido de materia seca, compactación, variación estacional de la microbiota epífita y metodología analítica) en los distintos experimentos, que pueden explicar la menor acidificación espontánea en el control de esta investigación.

Sin embargo, una mejor de reducción fue mostrada por los otros grupos experimentales de la investigación, los ensilados con aditivos BAL, especialmente en el de la cepa nativa (CM4) registra un pH final de 4.24, mientras que el control positivo muestra un valor final de 4.37. En estudios de Muck *et al.*, en 2018, mencionan que la inoculación con cepas de BAL homofermentativas redujo el pH de los ensilajes en pastos templados y tropicales y en alfalfa y otras leguminosas, pero no en maíz, sorgo y caña de azúcar. Lo cual resulta de utilidad, ya que en el ensilado de *A. salmiana*, la cepa nativa CM4, muestra resultados favorecedores sobre los otros grupos, lo cual es una ventaja competitiva al encontrarse en su medio natural.

Por otro lado, en la investigación de Macêdo *et al.*, en 2019, mencionan que, en ensilajes más húmedos, el pH puede rondar los 4,0, ya que este rango proporciona las condiciones ideales para el crecimiento de *Lactobacillus* spp. principalmente. Lo cual es un parámetro ideal para los resultados obtenidos en esta investigación, que rondan entre los 4.49 y 4.24 al final del proceso de fermentación. Enlazando estos resultados de pH con los de MS obtenidos (25%), y con los criterios que propone Macêdo *et al.* (2019) para calificar la fermentación del ensilado, podemos inquirir que el proceso se aleja de los umbrales de inestabilidad (pH > 4.8 para MS < 20%). Estos valores sugieren que la concentración de azúcares fue suficiente para permitir una caída del pH capaz de estabilizar el material, asegurando la preservación de la materia orgánica y minimizando riesgos de degradación proteica o crecimiento clostridial.

L-lactato

En la **tabla 12** se muestran los datos obtenidos de la medición de L-lactato de los distintos grupos a lo largo de 720 h de ensilado.

Tabla 12

L-lactato en ensilado de A. salmiana.

Tiempo (h)	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
0	0.047 ± 0.089	0.317 ± 0.179	4.612 ± 1.182
32	40.721 ± 5.581	61.844 ± 12.154	96.077 ± 31.424
72	40.100 ± 8.234	67.768 ± 5.169	102.616 ± 2.748
168	66.651 ± 13.832	89.113 ± 5.188	124.344 ± 8.791
720	108.947 ± 19.107	111.047 ± 14.917	128.183 ± 20.409

Nota. Valores de L-lactato expresados en g/kg MS. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n=3).

El perfil cinético del ácido L-lactato reveló una producción vigorosa y sostenida de este metabolito en todos los tratamientos evaluados, partiendo de concentraciones basales mínimas hasta alcanzar su máximo a las 720 horas de fermentación. En el control negativo y el control positivo (Biosile), los valores incrementaron de 0.05 a 108.95 g/kg MS y de 0.32 a 111.05 g/kg MS, respectivamente. No obstante, el tratamiento 1 (CM4) destacó significativamente al presentar una concentración inicial superior (4.61 g/kg MS) y finalizar con la acumulación más alta registrada (128.18 g/kg MS). Estos resultados evidencian una activación temprana del metabolismo láctico, particularmente eficiente en el inóculo CM4, el cual mantuvo una capacidad de síntesis superior durante todo el periodo experimental. Esta acumulación cuantitativa de lactato es un indicador directo de la dominancia de las bacterias ácido lácticas inoculadas y de una preservación energética óptima del

sustrato de agave. En el **gráfico 6** se puede observar que el punto máximo de acumulación de lactato es al final del ensilado en el caso de los tres grupos experimentales.

Se llevó a cabo un análisis estadístico de varianza lineal (ANOVA) **Tabla 30** (anexo), esto con el objetivo de evaluar posibles diferencias entre los grupos experimentales ($p < 0.05$), mediante una prueba de post hoc de Tukey (HSD) (**Tabla 32** en anexos), se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos, esto indica que todos los grupos experimentales muestran diferencias entre sí (Agrupación Tukey: CM4 =A; Biosile = B; Control =C).

El uso de aditivos microbiológicos, es eficiente a la hora de aumentar la cantidad de lactato producido en el proceso de ensilaje en comparación con que no se añadiera.

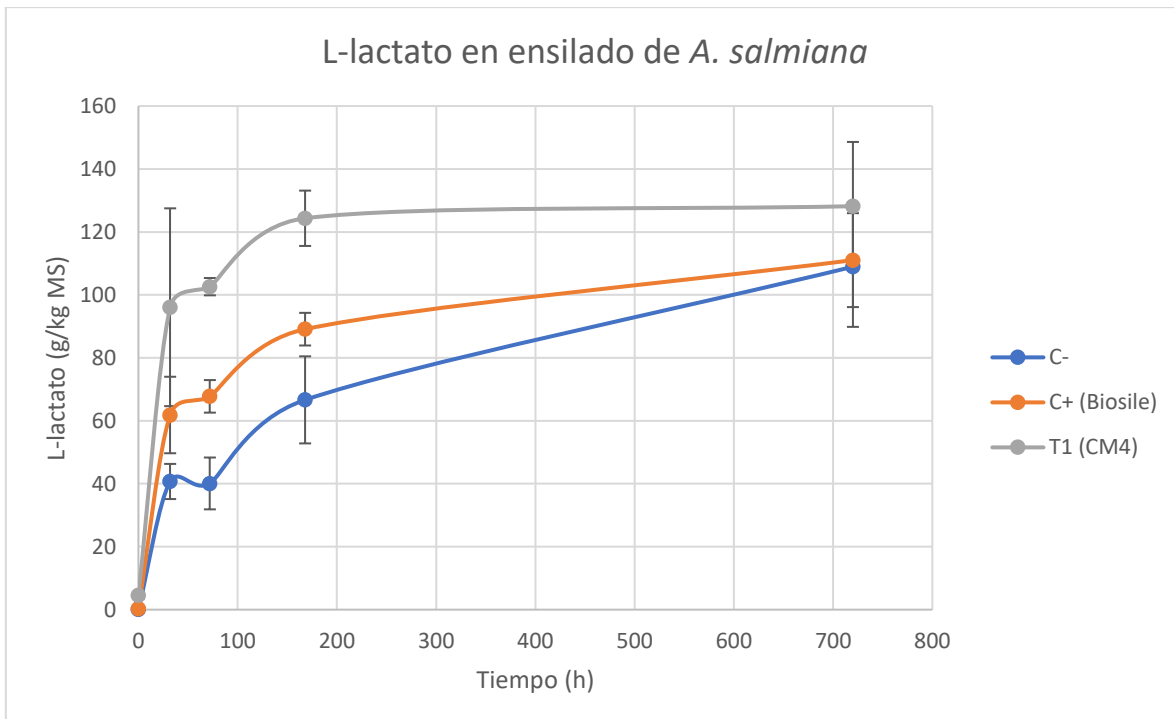


Gráfico 6: Acumulación de L-lactato durante de 720 horas de ensilado de *A. salmiana*. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

La magnitud y la rapidez de la producción de L-lactato son coherentes con informes previos de Gallardo-Martínez *et al.*, en 2023 que documentan la capacidad de bacterias epífitas de Agave para transformar fructanos y otros carbohidratos solubles en ácido láctico con alta eficiencia; cepas aisladas de *Agave salmiana* han mostrado la capacidad de convertir más del 70% de soluciones de fructanos en ácido láctico con escasos subproductos, lo que explica la elevada acumulación de lactato observada especialmente en el tratamiento con la cepa nativa CM4.

La superioridad del tratamiento 1 con la cepa CM4 en la acumulación de L-lactato puede explicarse por su adaptación epífita al sustrato rico en fructanos y por características funcionales (actividad fructolítica, rutas homofermentativas, formación de biopelículas que favorecen colonización y metabolismo eficiente) estas mismas características son observadas en aislamientos de microorganismos epífitos de Agave; trabajos recientes muestran que cepas de *Lacticaseibacillus* y *Enterococcus* aisladas de Agave utilizan fructanos eficazmente y pueden producir polisacáridos extracelulares y biofilms que potencian la fermentación dirigida de estos sustratos, lo que respaldaría el desempeño superior de una cepa nativa en su medio natural (Martha-Lucero *et al.*, 2023; Gallardo-Martínez *et al.*, 2023).

En los experimentos se obtuvieron datos de 108.947 g/kg de MS de L-lactato para el ensilado con fermentación espontánea (Control negativo) de *A. salmiana*, mientras que en el ensilado con aditivo comercial (Biosile) se obtuvo al final del ensilado 111.047 g/kg de MS y en el ensilado con aditivo nativo (CM4) se muestra con un resultado de 128.183 g/kg de MS de L-lactato. En resultados de Pinos-Rodríguez *et al.*, obtuvieron datos de 138 g/kg de MS de lactato en el ensilado de *A. salmiana* sin ningún tipo de aditivos al cabo de 720 h de ensilado, sin embargo, esta medición es de ambos isómeros de lactato (L-lactato y D-lactato) lo que sugiere un panorama aceptable en estos resultados. En investigación reciente de Alcantar-Morales *et al.*, evaluaron una fermentación espontánea de *A. salmiana* sin cepas iniciadoras, al día treinta, obtuvieron alrededor de 85 g/kg de MS de lactato, ellos sugieren y respaldan el uso de la microbiota epífita (silvestre) para el ensilado de agave sin inoculación con cepas iniciadoras. Sin embargo, este trabajo de

investigación comprueba la eficiencia del uso de cepas iniciadoras en el ensilado de *A. salmiana*, especialmente el uso de cepas provenientes de la misma planta, para aumentar la producción de lactato al final del ensilado y por ende mejorar la calidad y preservar el material vegetal en óptimas condiciones.

Saponinas

Los resultados se muestran en la **tabla 13** e indican que, aunque todos los tratamientos mostraron una disminución en las saponinas a lo largo del tiempo, el grupo de control negativo (sin aditivo), tuvo una disminución del contenido de saponinas del 5.01%, pasando de 18.026 a 17.123 g/kg MS, por otro lado, el control positivo (Biosile), mostró una disminución del 25.06%, yendo del 21.175 a 15.868 g/kg MS, mientras que el ensilado al que se le adicionó el aditivo CM4, disminuyó 34.453% de saponinas de 0 a 720 horas, esto porque pasó de 22.399 a 14.682 g/kg MS. Esto demuestra una clara diferencia entre los distintos tratamientos, ya que el tratamiento 1 (CM4) presentó la mayor reducción de saponinas al final del ensilado.

Tabla 13

Concentración de saponinas en ensilado de A. salmiana.

Tiempo (h)	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
0	18.026 ± 2.58	21.175 ± 3.71	22.399 ± 2.479
32	17.867 ± 1.48	19.461 ± 2.74	20.957 ± 0.622
72	17.667 ± 2.14	16.325 ± 1.59	16.277 ± 2.616
168	16.257 ± 1.78	16.548 ± 1.95	16.746 ± 1.153
720	17.123 ± 4.27	15.868 ± 0.93	14.682 ± 0.108

Nota. Valores de saponinas expresados en g/kg MS. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n=3).

Esto sugiere que este tratamiento (CM4) podría ser más efectivo en la degradación de saponinas en el ensilado de *A. salmiana*. Sin embargo, al someter los datos al análisis estadístico de ANOVA, **tabla 33** (anexo) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$), se realizó una prueba de post hoc de Tukey (HSD) (**Tabla 35** en anexos), en la que claramente no se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos.

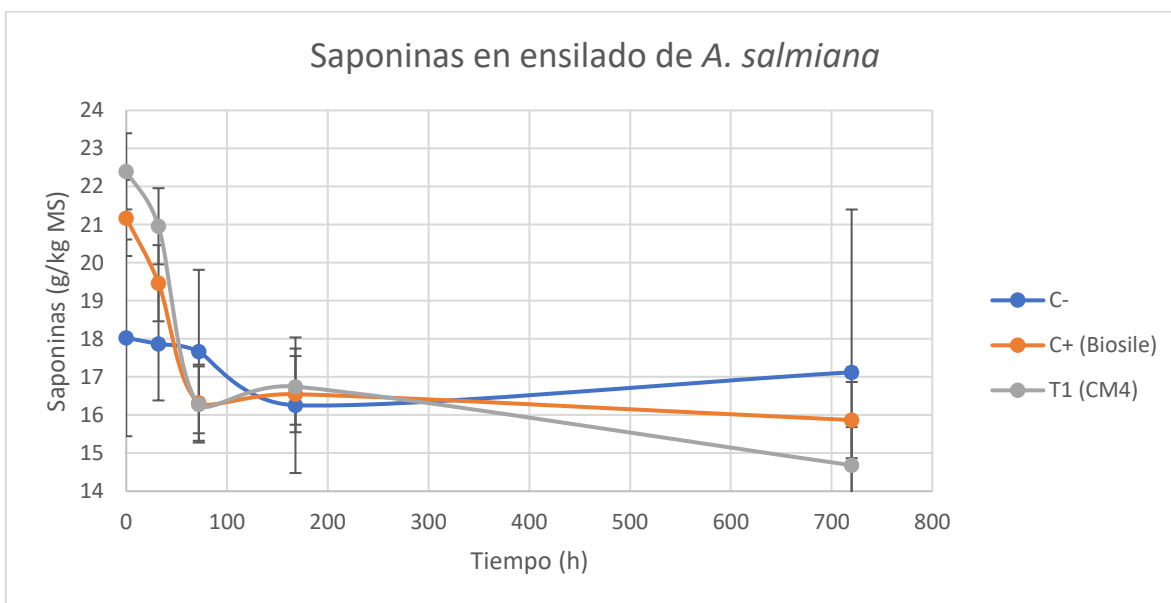


Gráfico 7: Concentración de saponinas durante de 720 horas de ensilado de *A. salmiana*. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar ($n=3$).

La magnitud de la disminución de saponinas en este experimento (aproximadamente 5-34% desde 0 h hasta 720 h según el tratamiento) es consistente con observaciones previas en microensilados de *A. salmiana* y en trabajos de caracterización de saponinas de Agave, que reportan reducciones lineales de saponinas durante la fermentación y una relación inversa entre duración del ensilado y contenido medible de saponinas. Pinos-Rodríguez *et al.*, en 2008 describieron disminuciones lineales de saponinas asociadas al avance de la

fermentación en hojas de *A. salmiana* y relacionaron estas pérdidas con el incremento de ácido láctico y la evolución microbiana, lo que respalda que la actividad fermentativa es un factor clave en la remoción o transformación de estas moléculas durante el ensilado.

Alternativamente, parte de la disminución observada podría responder a redistribución físico-química en el ensilado (retención en fracciones sólidas no extraídas con el método empleado) o a pérdida por lixiviados durante el manejo; por ello, la comparación entre tratamientos indica que la cepa CM4 no sólo favorece procesos fermentativos (mayor producción de lactato y mayor acidificación según los datos obtenidos) sino que también podría potenciar la biotransformación de saponinas mediante rutas enzimáticas específicas presentes en cepas nativas, hipótesis que han sido sugeridas en trabajos de aislamiento y estudio funcional de saponinas y microbios asociados a Agave según datos de investigaciones de Alcantar-Morales *et al.*, en 2024.

Oxalatos

Los resultados de Oxalatos se muestran en la **tabla 14** y en el **gráfico 8**, estos muestran que existe una disminución de este antinutriente a lo largo del proceso en el control negativo y el control positivo (Biosile), mientras que el tratamiento 1 se vuelve superior que al inicio.

Tabla 14

Oxalatos en ensilado de A. salmiana.

Tiempo (h)	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
0	68.503 ± 20.37	64.295 ± 16.80	64.312 ± 21.44
32	50.935 ± 5.77	48.736 ± 4.24	48.356 ± 9.88
72	44.497 ± 14.78	51.514 ± 1.67	54.791 ± 9.94
168	45.695 ± 0.84	52.803 ± 19.53	67.572 ± 16.20
720	45.366 ± 16.05	35.893 ± 3.46	74.490 ± 26.43

Nota. Valores de oxalatos expresados en g/kg MS. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n=3).

Al contrastar los tratamientos, se observa que la reducción de oxalatos no depende de la intensidad de la fermentación ácida, sino de la especificidad del inóculo. Mientras que el tratamiento 1 (CM4) fue el más eficiente en la caída de pH y consumo de azúcares, esta misma eficiencia provocó un incremento relativo de oxalatos (74.49 g/kg MS) al final del proceso. Este fenómeno se fundamenta en lo descrito por McDonald *et al.*, (1991), quienes explican que la degradación rápida de la fracción soluble reduce la masa total del ensilado, provocando una concentración de los componentes minerales no fermentables.

Por el contrario, el Control Positivo (Biosile) logró la menor concentración final de este antinutriente (35.89 g/kg MS), lo que puede sugerir que su formulación comercial posee una capacidad enzimática específica para degradar sales de oxalato que el inóculo CM4 no presenta, de acuerdo con investigaciones de Castillo Arteaga *et al.*, (2016). Aunque el tratamiento 1 es superior para conservar la energía del ensilado, el control positivo resulta más efectivo para reducir riesgos de toxicidad

mineral, un factor que Pinos-Rodríguez *et al.* (2008) señalan como decisivo cuando el agave constituye la base principal de la dieta animal.

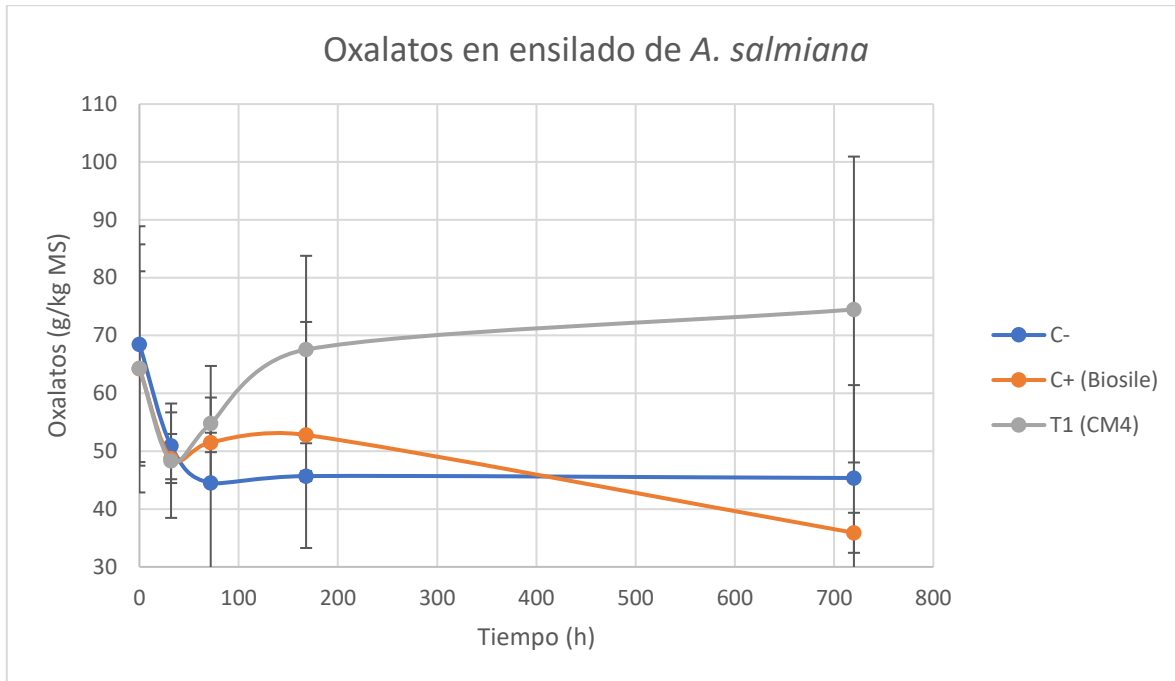


Gráfico 8: Oxalatos durante de 720 horas de ensilado de *A. salmiana*. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar (n=3).

Se llevó a cabo un análisis estadístico de varianza lineal (ANOVA) **Tabla 36** (anexo), esto con el objetivo de evaluar posibles diferencias entre los grupos experimentales ($p > 0.05$), y en complementario con una prueba de post hoc de Tukey (HSD) (**Tabla 38** en anexos), no se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos. Y aunque numéricamente el tratamiento 1 (CM4) presenta una mayor cantidad de oxalato final, la variabilidad entre réplicas y su valor de p, impiden declarar esa diferencia como estadísticamente significativa con el umbral convencional.

En 2021, Rahman *et al.*, ensilaron pasto Napier enano por 90 días, la finalidad de este estudio fue evaluar los efectos de la duración del ensilado sobre las características de fermentación, la composición nutricional y el contenido de oxalato. Los contenidos de oxalato soluble, insoluble y total en el ensilado disminuyeron a medida que aumentaba la duración del ensilado. Lo mismo sucede

en el ensilado de *A. salmiana* con y sin aditivo microbiológico, sin embargo, existe una clara diferencia entre los valores finales de cada grupo de estudio, mostrando mejores resultados para el control positivo (Biosile) que contiene aditivo comercial de BAL.

Alcantar-Morales *et al.*, en 2024 documentan dinámicas intensas de fermentación en pulpa de *A. salmiana* con picos de lactato y cambios microbianos durante las primeras semanas, y discuten pérdida de compuestos solubles y redistribución de metabolitos durante el ensilado; estos procesos apoyan la posibilidad de que los oxalatos libres varíen por liberación o pérdida en función de la cinética fermentativa y la generación de jugos.

Conclusiones

Durante 30 días, los datos del estudio mostraron que la adición de aditivos microbiológicos (nativo y comercial) para el ensilado de *A. salmiana* puede mejorar significativamente la calidad de la fermentación.

CM4 (*Lactobacillus pantheris*), la cepa nativa, demostró ventaja funcional y competente en esta investigación, al promover la mayor producción de L-lactato (16.5% mejor que los controles) ($p < 0.05$), una acidificación más rápida (70.5% mejor que el control negativo y 17.9% mejor que el control positivo de Biosile), una reducción más marcada de saponinas (38%) y una reducción más alta de materia seca (5% mejor que el control negativo), características que lo posicionan como el tratamiento más prometedor para mejorar la conservación y calidad del perfil microbiológico y fisicoquímico del ensilado de *Agave salmiana*. No obstante, dada la heterogeneidad observada en algunas variables (oxalatos) y limitaciones metodológicas, se recomienda complementar estos hallazgos con la validez experimental de los análisis propuestos antes de hacer recomendaciones de manejo a gran escala. Este estudio proporciona nuevos conocimientos sobre la adición de BAL al ensilado de *A. salmiana* y sobre todo la exploración de aditivos microbiológicos nativos en el proceso, como una opción biotecnológica viable y una promesa de la agricultura sostenible.

Financiamiento

Este proyecto de investigación realizado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. ha sido posible gracias al apoyo financiero recibido por Ciencia de Fronteras 2019, bajo el proyecto 1312404 “Ensilaje de la pulpa (guishe) de pencas de agave: dinámica e interacciones de las comunidades microbianas y efecto del ensilado en el microbioma del rumen”. Los financiadores no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos o la preparación del manuscrito. Se agradece profundamente el apoyo recibido, el cual ha sido fundamental para el desarrollo y éxito de este proyecto.

Resumen de datos

En esta sección se presenta un compendio de los resultados finales de los parámetros evaluados en el ensilado de *Agave salmiana* para los tres tratamientos: control negativo, control positivo (Biosile) y tratamiento 1 (CM4). En la **tabla 15**, se detallan los valores promedio, errores estándar y las comparaciones de medias utilizando la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Tabla 15

Resumen análisis estadísticos

Parámetro	Control negativo	Control + (Biosile)	Tratamiento 1 (CM4)
Pérdida de materia orgánica por CO ₂ (g)	5.5 ± 0.608 ^B	6 ± 0.513 ^{AB}	5.53 ± 0.296 ^A
Materia Seca (%)	25.15 ± 1.525 ^A	25.33 ± 0.408 ^B	25.13 ± 0.092 ^B
Azúcares reductores (mg/g MS)	2.207 ± 0.486 ^B	3.728 ± 0.839 ^B	7.532 ± 2.579 ^A
pH	4.493 ± 0.034 ^A	4.337 ± 0.019 ^B	4.240 ± 0.006 ^C
L- lactato (g/kg MS)	108.947 ± 19.107 ^C	111.047 ± 14.917 ^B	128.183 ± 20.409 ^A
Saponinas (g/kg MS)	17.123 ± 4.274 ^A	15.868 ± 0.930 ^A	14.682 ± 0.108 ^A
Oxalatos (g/kg MS)	45.366 ± 16.055 ^A	35.893 ± 3.460 ^A	74.490 ± 26.437 ^A

Nota. Los datos se presentan como la media ± desviación estándar (n=3) y comparación por fila de medias con parejas de Tukey ($p < 0.05$)

Estos resultados indican que el uso de aditivos específicos como CM4 puede mejorar significativamente ciertos parámetros de calidad en el ensilado de *A. salmiana*, especialmente en términos de pH y producción de ácido láctico.

Anexos

Preparación de Buffer de fosfatos (PBS)

Para preparar 100 ml de solución final:

9.32 ml de Na_2HPO_4 al 14.2%

0.68 ml de NaH_2PO_4 al 12%

Aforar a 100 ml con agua purificada y esterilizar

Análisis estadísticos

Reactivación de la cepa CM4

Tabla 16

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Muestra	2	0.09040	0.045200	7.66	0.007
Error	12	0.07077	0.005898		
Total	14	0.16117			

Tabla 17

Comparaciones por parejas de Tukey: tratamientos (confianza de 95%)

Muestra	N	Media	Agrupación	
C	5	4.98071	A	
A	5	4.89019	A	B
B	5	4.79063	B	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pérdida de materia orgánica por CO₂

Tabla 18

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo	1	145.067	145.067	8.74	0.010
Tratamiento	2	141.641	70.821	4.27	0.036
Error	14	232.348	16.596		
Falta de ajuste	2	0.234	0.117	0.01	0.994
Error puro	12	232.113	19.343		
Total	17	519.056			

Tabla 19

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4.07385	55.24%	45.64%	26.00%

Tabla 20

Comparaciones por parejas de Tukey: tratamientos (confianza de 95%)

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3	6	139.167	A
2	6	138.433	A B
1	6	132.883	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Materia seca

Tabla 21

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo (h)	4	111.32	27.831	8.5	0.000
Tratamiento	2	32.85	16.427	5.02	0.012
Error	38	124.45	3.275		
Falta de ajuste	8	38.13	4.766	1.66	0.151
Error puro	30	86.32	2.877		
Total	44	268.62			

Tabla 22

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.142370	53.67%	46.36%	35.03%

Tabla 23

Comparaciones por parejas de Tukey: tratamientos (confianza de 95%)

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	15	27.6008	A
2	15	25.9203	B
3	15	25.6801	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Azúcares reductores

Tabla 24

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo (h)	4	18255.1	4563.78	145.98	0.000
Tratamiento	2	348.9	174.46	5.58	0.007
Error	38	1188.0	31.26		
Falta de ajuste	8	521.9	65.23	2.94	0.015
Error puro	30	666.1	22.20		
Total	44	19792.0			

Tabla 25

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0001800	94.00%	93.05%	91.58%

Tabla 26

Comparaciones por parejas de Tukey: tratamientos (confianza de 95%)

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3	15	0.0009325	A
2	15	0.0007803	B
1	15	0.0007625	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

pH

Tabla 27

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo (h)	4	4.1574	1.0393	51.28	0.000
Tratamiento	2	0.67201	0.3360	16.58	0.000
Error	38	0.7702	0.02027		
Falta de ajuste	8	0.7067	0.0883	41.76	0.000
Error puro	30	0.0634	0.00212		
Total	44	5.59968			

Tabla 28

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.142370	86.25%	84.07%	80.71%

Tabla 29

Comparaciones por parejas de Tukey: tratamientos (confianza de 95%)

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	15	4.86533	A
2	15	4.71667	B
3	15	4.56600	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

L-lactato

Tabla 30

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo (h)	4	66161	16540.3	67.62	0.000
Tratamiento	2	12196	6097.9	24.93	0.000
Error	38	9296	244.6		
Falta de ajuste	8	4156	519.6	3.03	0.013
Error puro	30	5139	171.3		
Total	44	87653			

Tabla 31

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.403001	89.39%	87.72%	85.13%

Tabla 32

Comparaciones por parejas de Tukey: tratamientos (confianza de 95%)

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3	15	91.1665	A
2	15	66.0178	B
1	15	51.2931	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Saponinas

Tabla 33

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo (h)	4	148.507	37.127	6.74	0.000
Tratamiento	2	5.149	2.574	0.47	0.630
Error	38	209.304	5.508		
Falta de ajuste	8	52.755	6.594	1.26	0.299
Error puro	30	156.549	5.218		
Total	44	362.960			

Tabla 34

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
42.7873	42.33%	33.23%	19.13%

Tabla 35

Comparaciones por parejas de Tukey: tratamientos (confianza de 95%)

Tratamiento	N	Media	Agrupación
1	15	477.734	A
3	15	468.425	A
2	15	463.043	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Oxalatos

Tabla 36

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo (h)	4	1597	399.2	1.76	0.158
Tratamiento	2	1229	614.3	2.70	0.080
Error	38	8640	227.4		
Falta de ajuste	8	2159	269.9	1.25	0.306
Error puro	30	6481	216.0		
Total	44	11465			

Tabla 37

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.403001	24.64%	12.75%	0.00%

Tabla 38

Comparaciones por parejas de Tukey: tratamientos (confianza de 95%)

Tratamiento	N	Media	Agrupación
3	15	61.9041	A
2	15	50.9991	A
1	15	50.6482	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Referencias

- Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974>
- Agrawal, D., & Kumar, V. (2023). Recent progress on sugarcane-bagasse based lactic acid production: Technical advancements, potential and limitations. *Industrial Crops and Products*, 193, 116132. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116132>
- Alcantar-Morales, S. L., Ramírez-Ortiz, A., Gallardo-Martínez, D., Favela-Torres, E., Cruz-Guerrero, A. E., & Viniegra-González, G. (2024). *Kinetics and microbiology of pulp silage from decorticated Agave salmiana leaves*. 4, 14–29. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.4.14>
- Alducin-Martínez, C., Ruiz Mondragón, K. Y., Jiménez-Barrón, O., Aguirre-Planter, E., Gasca-Pineda, J., Eguiarte, L. E., & Medellín, R. A. (2022). Uses, Knowledge and Extinction Risk Faced by Agave Species in Mexico. *Plants*, 12(1), 124. <https://doi.org/10.3390/plants12010124>
- Atilgan, G. B. (2023). The investigation of the effect of silage additives on silage microbiology. *Veterinary Sciences and Management*, 37. ISBN: 978-625-367-351-2
- Ávila, C. L. S., & Carvalho, B. F. (2020). Silage fermentation—Updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 966–984. <https://doi.org/10.1111/jam.14450>
- Bernardes, T. F., Daniel, J. L. P., Adesogan, A. T., McAllister, T. A., Drouin, P., Nussio, L. G., Huhtanen, P., Tremblay, G. F., Bélanger, G., & Cai, Y. (2018). Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4001–4019. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13703>
- Bernardino-Nicanor, A., & González-Cruz, L. (2023). *Influencia del tiempo de desarrollo y ubicación de las hojas dentro de la roseta del Agave salmiana sobre su contenido de minerales*.

Bethsua Mendoza Mendoza & Brianda Susana Velázquez de Lucio. (2023). Comprehensive use of *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural Sciences Research* (2764-0973), 3(16), 2–13. <https://doi.org/10.22533/at.ed.9733162305109>

Blas-Yañez, S., & Thomé-Ortiz, H. (2021). Agave pulquero (*Agave salmiana*), socio-economic and agro-ecological importance and its development perspectives: A literature review. *Ciência Rural*, 51, e20200441. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200441>

Borreani, G., Piano, S., & Tabacco, E. (2014). Aerobic stability of maize silage stored under plastic films with different oxygen permeability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(13), 2684–2690. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6609>

Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. E. (2018). *Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages*. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3952–3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>

^bPinos-Rodríguez, J. M., Gonzalez-Muñoz, S., Badillo, B., García-López, J. C., Aguirre-Rivera, J. R., & Infante, S. (2008). Chemical Composition and Ruminant in vitro Degradation of Fresh or Silage of *Agave salmiana* Otto ex. Salm-Dick. *Journal of Applied Animal Research*, 33(1), 45–48. <https://doi.org/10.1080/09712119.2008.9706894>

Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D. K., Felis, G. E., Torriani, S., & Dellaglio, F. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *Argentoratensis* subsp. Nov., isolated from vegetable matrices. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 4), 1629–1634. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63333-0>

Campos-Herrera, O., González-Cruz, L., Silva-Martínez, G. A., Flores-Martínez, N. L., Ortiz-Basurto, R. I., & Bernardino-Nicanor, A. (2025). Physicochemical Differences in the Leaves of the Two *Agave salmiana* Subspecies Grown in Different Regions. *Agriculture*, 15(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/agriculture15020134>

Carvalho, B. f., Sales, G. f. c., Schwan, R. f., & Ávila, C. I. s. (2021). Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 341–355. <https://doi.org/10.1111/jam.14833>

Castillo Arteaga, R. D., Burbano-Rosero, E. M., Otero Ramirez, I. D., & Fernández Izquierdo, P. (2016). Degradación de oxalato por bacterias oxalotróficas asociadas a plantas del género *Oxalis* sp en regiones Andinas del departamento de Nariño, Colombia. *Universidad y Salud*, 18(1), 69–78. <https://doi.org/10.22267/rus.161801.20>

Conservación de forrajes (V): Fundamentos del ensilado. (s/f). *Revistafrisona.com*. <https://www.revistafrisona.com/Noticia/conservacion-de-forrajes-v-fundamentos-del-ensilado>

Davis, S. C., & Ortiz-Cano, H. G. (2023). Lessons from the history of Agave: Ecological and cultural context for valuation of CAM. *Annals of Botany*, 132(4), 819–833. <https://doi.org/10.1093/aob/mcad072>

Delgadillo Ruíz, L., Bañuelos Valenzuela, R., Esparza Ibarra, E. L., Gutiérrez Bañuelos, H., Cabral Arellano, F. J., Muro Reyes, A., Delgadillo Ruíz, L., Bañuelos Valenzuela, R., Esparza Ibarra, E. L., Gutiérrez Bañuelos, H., Cabral Arellano, F. J., & Muro Reyes, A. (2015). Evaluación del perfil de nutrientes de bagazo de agave como alternativa de alimento para rumiantes. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(SPE11), 2099–2103. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i11.778>

Dempsey, E., & Corr, S. C. (2022). *Lactobacillus* spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840245>

Diogénes, L. V., Pereira Filho, J. M., Edvan, R. L., de Oliveira, J. P. F., Nascimento, R. R. do, Santos, E. M., Alencar, E. J. S., Mazza, P. H. S., Oliveira, R. L., & Bezerra, L. R. (2023). Effect of Different Additives on the Quality of Rehydrated Corn Grain Silage: A Systematic Review. *Ruminants*, 3(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ruminants3040035>

Fabiszewska, A. U., Zielińska, K. J., & Wróbel, B. (2019). Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: A minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 76. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2>

Figueredo-Urbina, C. J., Álvarez-Ríos, G. D., García-Montes, M. A., & Octavio-Aguilar, P. (2021). Morphological and genetic diversity of traditional varieties of agave in Hidalgo State, Mexico. *PLOS ONE*, *16*(7), e0254376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254376>

Gallardo-Martínez, D., Viniegra-González, G., Figueroa-Martínez, F., Rocha, J., Cruz-Guerrero, A., & Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. (2023). Isolation and characterization of epiphytic, fructanolytic, homofermentative lactic acid bacteria from *Agave salmiana*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *23*(1), 1–8. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim24142>

George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F. J., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., & Foligné, B. (2018). Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2899. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>

Getabalew, M., Mindaye, A., & Alemneh, T. (2022). *Silage and Enzyme Additives as Animal Feed and Animals Response*. *2*, 1–6. <https://doi.org/10.33552/AAHDS.2022.02.000543>

González, M. (2016). *Biopreservación del ensilaje por bacterias ácido lácticas productoras de antimicrobianos a partir de glicerina cruda*.

Guo, X., Xu, D., Li, F., Bai, J., & Su, R. (2023). Current approaches on the roles of lactic acid bacteria in crop silage. *Microbial Biotechnology*, *16*(1), 67–87. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14184>

Hernández-Mendoza, A. G., Ruiz, H. A., Ortiz-Ceballos, Á. I., Castro-Luna, A. A., Láinez, M., & Martínez-Hernández, S. (2024). Ethanol production from *Agave salmiana* leaf juices by consolidated bioprocessing comparing two strains of *Kluyveromyces marxianus*. *Industrial Crops and Products*, *208*, 117839. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117839>

Hiai, S., Oura, H., & Nakajima, T. (1976). Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. 116–122.

Holzappel, W. H., & Wood, B. J. B. (2014). Introduction to the LAB. En Lactic Acid Bacteria (pp. 1–12). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch1>

Jatkauskas, J., Amaral, R. C. do, Witt, K. L., Joergensen, J. N., Eisner, I., & Vrotniakiene, V. (2025). Early Fermentation Dynamics and Aerobic Stability of Maize Silage Improved by Dual-Strain Lactic Acid Bacteria Inoculation. *Fermentation*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/fermentation11050293>

Jiang, S., Cai, L., Lv, L., & Li, L. (2021). *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01537-y>

Jie Bai, Jie Bai, Zitong Ding, Zitong Ding, Rina Su, Rongguo Su, Musen Wang, Musen Wang, Mengyan Cheng, Mengyan Cheng, Dongmei Xie, Dongmei Xie, Guo, X., & Xusheng Guo. (2022). Storage Temperature Is More Effective Than Lactic Acid Bacteria Inoculations in Manipulating Fermentation and Bacterial Community Diversity, Co-Occurrence and Functionality of the Whole-Plant Corn Silage. *Microbiology spectrum*, e0010122–e0010122. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00101-22>

Kholif, A. E. (2023). A Review of Effect of Saponins on Ruminal Fermentation, Health and Performance of Ruminants. *Veterinary Sciences*, 10(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070450>

König, H., & Fröhlich, J. (2017). Lactic Acid Bacteria. En H. König, G. Unden, & J. Fröhlich (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3–41). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1

Kung, L. (2014). A REVIEW ON SILAGE ADDITIVES AND ENZYMES. [A REVIEW ON SILAGE ADDITIVES AND ENZYMES \(udel.edu\)](https://udel.edu)

Kung, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). *Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages*. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>

Lijuan Chen, Yili Wang, Li Xi, Jennifer W. MacAdam, & Yunhua Zhang. (2023). Interaction between plants and epiphytic lactic acid bacteria that affect plant silage fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1164904>

Liu, B., & Dong, X. (2002). *Lactobacillus pantheris* sp. Nov., isolated from faeces of a jaguar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 5), 1745–1748. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1745>

Lucila Márquez-Pallares, Juan Aguila-Muñoz, J. A. Honorato-Salazar, & Sergio Rubén Trejo-Estrada. (2024). MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSES OF Agave salmiana VARIETIES. *Agrociencia*. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v58i2.2841>

Macêdo, A. J. da S., Neto, J. M. C., Silva, M. A. da, & Santos, E. M. (2019). Potencialidades e limitações de plantas forrageiras para ensilagem: Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.5935/rbhsa.v13i2.520>

Martha-Lucero, N., Viniegra-González, G., González-Olivares, L., & Cruz-Guerrero, A. (2023). Biofilm formation by agave epiphytic lactic acid bacteria fed with agave fructans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(11), 299. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03749-3>

McCleary, B. V. (2018). Total Dietary Fiber (CODEX Definition) in Foods and Food Ingredients by a Rapid Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatography: Collaborative Study, First Action 2017.16. *Journal of AOAC International*. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0180>

McCleary, B. V., McLoughlin, C., Charmier, L. M. J., & McGeough, P. (2020). Measurement of available carbohydrates, digestible, and resistant starch in food ingredients and products. *Cereal Chemistry*, 97(1), 114–137. <https://doi.org/10.1002/cche.10208>

McDonald, P., Henderson, A. R., & Heron, S. J. E. (1991). *The biochemistry of silage* (2.^a ed.). Chalcombe Publications.

Medina-Saavedra, T., Dzul-Cauich, J., Arroyo-Figueroa, G., García-Vieyra, I., Quiñones-Páramo, M., Mexicano-Santoyo, L., Medina-Saavedra, T., Dzul-Cauich, J., Arroyo-Figueroa, G., García-Vieyra, I., Quiñones-Páramo, M., & Mexicano-Santoyo, L. (2021). Microorganismos de montaña y ensilado de maíz como probióticos en la engorda de conejos. *Abanico veterinario*, 11. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.7>

Michael G. Gänzle, & Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current opinion in food science*, 2(2), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>

Mishra, D. P., Mishra, N., Musale, H. B., Samal, P., Mishra, S. P., & Swain, D. P. (2017). *Determination of seasonal and developmental variation in oxalate content of Anagallis arvensis plant by titration and spectrophotometric method.*

Mosqueda-Hernández, C. (2023). Interacciones entre bacterias ácido lácticas del ensilado de pulpa de Agave salmiana y producción de lactato. Centro de Investigación y desarrollo, A.C.

Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. (2018). *Revisión de ensilaje: Avances recientes y usos futuros de los aditivos para ensilado.* *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>

Nayagam, J. R., & Rajan, R. (2021). Calcium Oxalate Crystals as Raw Food Antinutrient: A Review. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 295–301. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i41B32368>

Nazar, M., Wang, S., Zhao, J., Dong, Z., Li, J., Kaka, N. A., & Shao, T. (2020). The feasibility and effects of exogenous epiphytic microbiota on the fermentation quality and microbial community dynamics of whole crop corn. *Bioresource Technology*, 306, 123106. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123106>

Neto, J. M. C., Santos, B. R. C. dos, Perazzo, A. F., Silva, A. L. da, Santos, F. N. de S., Pereira, D. M., Macêdo, A. J. da S., & Santos, E. M. (2020). ADDITIVES AND

PREMISES USED TO OBTAIN HIGH QUALITY SILAGES. *Nucleus Animalium*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.3738/21751463.3668>

Ogunade, I. M., Jiang, Y., Pech Cervantes, A. A., Kim, D. H., Oliveira, A. S., Vyas, D., Weinberg, Z. G., Jeong, K. C., & Adesogan, A. T. (2018). Bacterial diversity and composition of alfalfa silage as analyzed by Illumina MiSeq sequencing: Effects of *Escherichia coli* O157:H7 and silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 2048–2059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12876>

Okoye, C. O., Wang, Y., Gao, L., Wu, Y., Li, X., Sun, J., & Jiang, J. (2023). The performance of lactic acid bacteria in silage production: A review of modern biotechnology for silage improvement. *Microbiological Research*, 266, 127212. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127212>

Pinos-Rodríguez, J. M., Zamudio, M., & González, S. S. (2008). The effect of plant age on the chemical composition of fresh and ensiled *Agave salmiana* leaves. *South African Journal of Animal Science*, 38(1), Article 1. <https://doi.org/10.4314/sajas.v38i1.4108>

Pretz, J. (2020, septiembre 23). *Understanding the process of corn silage fermentation and starch availability*. Understanding the Process of Corn Silage Fermentation and Starch Availability | Hubbard Feeds. <https://www.hubbardfeeds.com/blog/understanding-process-corn-silage-fermentation-and-starch-availability>

Rahman, M. M., Said, N. N. B., Mat, K. B., Rusli, N. D., & Raja Ili Airina, R. K. (2021). Effect of ensiling duration on nutritional composition and oxalate content in dwarf Napier grass silage. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 756(1), 012039. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/756/1/012039>

Ramos, B. L. P., Pires, A. J. V., Cruz, N. T., Santos, A. P. D. S. D., Nascimento, L. M. G., Santos, H. P., & Amorim, J. M. S. (2021). Perdas no Processo de Ensilagem: Uma breve revisão. *Research, Society and Development*, 10(5), e8910514660. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14660>

Reimer, L. C., Sardà Carbasse, J., Koblitz, J., Ebeling, C., Podstawka, A., & Overmann, J. (2022). BacDive in 2022: The knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D741–D746. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab961>

Ribeiro, B. D., Alviano, D. S., Barreto, D. W., & Coelho, M. A. Z. (2013). Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.08.007>

Robles-Arias, M., Guzmán-Rodríguez, F., & Cruz-Guerrero, A. (2024). Evaluation of the Suitability of *Agave salmiana* Leaves for Fructooligosaccharides Recovery. *ACS Food Science & Technology*, 4(7), 1626–1631. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00668>

Ruvalcaba-Gómez, J. M., Arteaga-Garibay, R. I., Domínguez-Araujo, G., Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Galindo-Barboza, A. J., Salazar-Rodríguez, G., Martínez-Peña, M. D., & Delgado-Macuil, R. J. (2019). USO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PARA DESCONTAMINACIÓN DE ESTIÉRCOL PORCINO MEDIANTE ENSILAJE EXPERIMENTAL. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(1), 247–257. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.01.18>

Sandoval-Zapotitla, E., Chávez-Güitrón, L. E., Salinas-Pérez, F. del C., Rosas, U., & Vallejo-Zamora, A. (2024). Anatomical-Foliar Diversity of *Agave salmiana* subsp. *Salmiana* (Asparagaceae) in Three Populations of the Teotihuacán Region (Mexico). *Plants*, 13(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/plants13223195>

Santiago-Martínez, A., Pérez-Herrera, A., Martínez-Gutiérrez, G. A., & Meneses, M. E. (2023). Contributions of agaves to human health and nutrition. *Food Bioscience*, 53, 102753. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102753>

Shouxin Sheng, Shouxin Sheng, Yubing Fu, Yubing Fu, Na Pan, Na Pan, Haochi Zhang, Haochi Zhang, Lei Xiu, Lei Xiu, Yanchen Liang, Yanchen Liang, Yang Liu,

- Yang Liu, Bohui Liu, Bohui Liu, Cheng Ma, Cheng Ma, Ruiping Du, ... Xiao Wang. (2022). Novel exopolysaccharide derived from probiotic *Lactobacillus pantheris* TCP102 strain with immune-enhancing and anticancer activities. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1015270>
- Silva-López, N. L., Martínez-Hernández, S., & Figueredo-Urbina, C. J. (2025). Microorganismos asociados al aguamiel en el agave pulquero en Hidalgo, México. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 12(24), Article 24. <https://doi.org/10.29057/icbi.v12i24.12206>
- Sj, V., Vs, P., & Re, K. (2021). Antinutritional factors in foods. *The Pharma Innovation Journal*, 10(7), 01–04.
- Śliżewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. *Biology*, 9(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/biology9120423>
- Soundharrajan, I., Park, H. S., Rengasamy, S., Sivanesan, R., & Choi, K. C. (2021). Application and Future Prospective of Lactic Acid Bacteria as Natural Additives for Silage Production—A Review. *Applied Sciences*, 11(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/app11178127>
- Stephen, J. M., & Saleh, A. M. (2023). Homofermentative *Lactobacilli* isolated from organic sources exhibit potential ability of lactic acid production. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1297036>
- Sun, L., Bai, C., Xu, H., Na, N., Jiang, Y., Yin, G., Liu, S., & Xue, Y. (2021). Succession of Bacterial Community During the Initial Aerobic, Intense Fermentation, and Stable Phases of Whole-Plant Corn Silages Treated With Lactic Acid Bacteria Suspensions Prepared From Other Silages. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.655095>
- Tahir, M., Li, J., Xin, Y., Wang, T., Chen, C., Zhong, Y., Zhang, L., Liu, H., He, Y., Wen, X., & Yan, Y. (2023). Response of fermentation quality and microbial community of oat silage to homofermentative lactic acid bacteria inoculation. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1091394>

Temür, C., Güney, M., Erdoğan, S., & Demirel, M. (2021). Inhibition of Toxic Effects of Oxalate in Sugar Beet Pulp with Adding Ca During Ensiling. *Hayvan Bilimi ve Ürünleri Dergisi*, 4(2), Article 2. <https://doi.org/10.51970/jasp.1012891>

Todorov, S. D., Dioso, C. M., Liong, M.-T., Nero, L. A., Khosravi-Darani, K., & Ivanova, I. V. (2022). Beneficial features of pediococcus: From starter cultures and inhibitory activities to probiotic benefits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03419-w>

Wang, N., Xiong, Y., Wang, X., Guo, L., Lin, Y., Ni, K., & Yang, F. (2022). Effects of *Lactobacillus plantarum* on Fermentation Quality and Anti-Nutritional Factors of Paper Mulberry Silage. *Fermentation*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040144>

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

Yang, F., Wang, Y., Zhao, S., Feng, C., & Fan, X. (2022). Dynamics of the Fermentation Products, Residual Non-structural Carbohydrates, and Bacterial Communities of Wilted and Non-wilted Alfalfa Silage With and Without *Lactobacillus plantarum* Inoculation. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.824229>

Yanza, Y. R., Irawan, A., Jayanegara, A., Ramadhani, F., Respati, A. N., Fitri, A., Hidayat, C., Niderkorn, V., Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Hidayat, R., & Tanuwiria, U. H. (2024). Saponin Extracts Utilization as Dietary Additive in Ruminant Nutrition: A Meta-Analysis of In Vivo Studies. *Animals*, 14(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ani14081231>

Zamudio, D. M., Pinos-Rodríguez, J. M., González, S. S., Robinson, P. H., García, J. C., & Montañez, O. (2009). Effects of *Agave salmiana* Otto Ex Salm-Dyck silage as forage on ruminal fermentation and growth in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 148(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.02.002>

Zhao, X., Sun, Y., Chang, Z., Yao, B., Han, Z., Wang, T., Shang, N., & Wang, R. (2024). Innovative Lactic Acid Production Techniques Driving Advances in Silage Fermentation. *Fermentation*, 10(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/fermentation10100533>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>