



# Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias

<http://rccp.udea.edu.co>

RCCP

## Estudio microbiológico y calidad nutricional del ensilaje de maíz en dos ecorregiones de Colombia<sup>✠</sup>

*Study of microbiological and nutritional quality of corn silage in two Colombian ecosystems*

*Estudo microbiológico e qualidade nutricional da silagem de milho nas duas eco-regiões da Colômbia*

Andrés F Villa<sup>1</sup>, Zoot; Adelina P Meléndez<sup>2</sup>, Microb, Msc; Juan E Carulla<sup>1</sup>, Zoot, PhD; Martha L Pabón<sup>1</sup>, Quim, PhD; Edgar A Cárdenas<sup>1\*</sup>, Zoot, Msc.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Nutrición Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia,

<sup>2</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

(Recibido: 18 septiembre, 2009; aceptado: 19 enero, 2010)

### Resumen

*El presente estudio buscó establecer los cambios en la concentración inicial de los géneros de bacterias ácido lácticas (BAL) en dos variedades de maíz utilizado para ensilar en clima cálido y frío respectivamente. Se realizaron microsilos de 1.5 kg para comparar la curva de crecimiento de cada uno de estos géneros a lo largo del proceso, con mediciones en los días 0,1,2,3,4,7,14,28 y 56 de cerrado el silo. Se compararon las variaciones en el pH, la concentración de ácido acético, ácido láctico y azúcares reductores en los ensilajes de maíz y se evaluó la variación en la calidad nutricional del forraje fresco con respecto al ensilaje al final del proceso. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones iniciales de BAL entre los tratamientos, siendo mayor para el maíz proveniente de clima cálido. El pH para el maíz de clima cálido disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) más rápido que el de clima frío, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en su concentración final. Se presentó un incremento en las poblaciones de BAL, desde el inicio el proceso fermentativo y hasta que el pH alcanzó niveles por debajo de cuatro, excepto para el género de pediococos los cuales alcanzaron su mayor crecimiento a pH cercano a 3.9, siendo significativamente mayor para las BAL de clima cálido. Inicialmente los géneros de lactobacilos y leuconostoc fueron los más abundantes en ambos climas, seguidos por los streptococos y pediococos. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de ácidos orgánicos, ni azúcares reductores entre tratamientos. La calidad nutricional de los ensilajes no varió con respecto al forraje fresco, indicando un óptimo proceso de ensilaje en donde las pérdidas de nutrientes fueron mínimas para ambos climas.*

✠ Para citar este artículo: Villa AF, Meléndez AP, Carulla JE, Pabón ML, Cárdenas EA. Estudio microbiológico y calidad nutricional del ensilaje de maíz en dos ecorregiones de Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu 2010; 23:65-77

\* Autor para correspondencia: Departamento de Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Teléfono: (571) 3165000 Ext. 19403 Correo electrónico: eacardenasr@unal.edu.co.

**Palabras clave:** ácido láctico, bacterias ácido-lácticas, fermentación, lactobacilos, pediococos.

#### Summary

*Initial concentration of the most important genus of lactic acid bacteria (LAB) in two maize varieties (warm and cold climate respectively) was evaluated. Growth rate for each genus throughout the process was compared at 0.1.2.3.4.7.14.28 and 56 days from silage sealed. Variation in pH, acetic acid, lactic acid and reducer sugars concentration were compared within silos. Nutritional quality between fresh forage and final silage was also evaluated. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found in the initial concentrations of LAB between treatments, being greater for warm climate. pH value in this treatment diminished significantly ( $p < 0.05$ ) faster than the one of cold climate, although there were not significant differences in their final concentration. An increase in the LAB populations was observed from the fermentation beginning until pH reached levels below four, except for pediococci genus who reached their greater growth at pH near 3,9 being significantly greater for warm climate LAB. Initially the Lactobacilli and Leuconostoc genus had more concentration in both climates, followed by the Streptococci and pediococci. There were not differences in the organic acid concentrations, nor reducer sugars between treatments. Silage Nutritional quality was similar to fresh forage, indicating an optimal conservation process.*

**Key Words:** fermentation, lactic acid, lactic acid bacteria, lactobacill, pediococci.

#### Resumo

*O presente estudo procurou estabelecer as mudanças na concentração inicial dos gêneros de bactérias ácido lácticas (BAL) em duas variedades de milho usado para silagem de clima quente e frio. Realizaram-se microsilos de 2 kg para comparar a curva de crescimento da cada um destes gêneros ao longo do processo, com medições nos dias 0,1,2,3,4,7,14,28 e 56 de fechado o silo. Compararam-se as variações no pH, a concentração de ácido acético, ácido láctico e açúcares redutores na silagem de milho. Observaram-se diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) nas concentrações iniciais de BAL entre os tratamentos, sendo maior para o milho de clima quente. O pH para o milho de clima quente diminuiu significativamente ( $p < 0.05$ ) mais rápido do que o clima frio, no entanto não se encontraram diferenças significativas em sua concentração final. Apresentou-se um incremento nas populações de BAL, desde o início o processo de fermentação e até que o pH alcançou níveis por embaixo de 4, exceto para o gênero pediococos os quais atingiram seu maior crescimento a pH próximo a 3.9, sendo significativamente maior para as BAL de clima quente. Inicialmente os gêneros de lactobacilos e leuconostoc foram os mais abundantes em ambos climas, seguidos pelos streptococos e pediococos. Não se observaram diferenças significativas nas concentrações de ácidos orgânicos, nem açúcares redutores entre tratamentos.*

**Palavras chave:** ácido láctico, bactérias ácido lácticas, Lactobacillus, Pediococcus.

## Introducción

La utilización de forrajes conservados, es una opción económica y ecológica para mejorar la disponibilidad de alimento en épocas críticas de producción (FAO, 1999 y Mahecha y Gallego, 2002). El ensilaje requiere menor uso de maquinaria e infraestructura y es menos dependiente del clima, con respecto a la henificación o el henolaje (Weiss, 1996). Su principio de conservación es una rápida disminución del pH, gracias a la producción de ácidos orgánicos por las bacterias ácido lácticas (BAL) que impide crecimiento microbiano y la actividad de las enzimas endógenas catabólicas

de la planta preservando el alimento (FAO, 1999 y Bolsen et al., 1992). Las características del forraje que determinan la calidad de la fermentación son su contenido de materia seca, carbohidratos solubles, capacidad buffer y la microflora epifita con la que comienza el proceso fermentativo (Weiss, 1996 y Bolsen et al., 1992). Dentro de esta flora, las BAL son las que más efectivamente reducen el pH del silo ya que producen ácido láctico como principal producto fermentativo (Ashbell y Weinberg, 1999 y D'mello, 2002). Este ácido es el más eficiente de la fermentación (menor pérdida de energía en el forraje) y es el ácido orgánico de mayor poder

acidificante. Así, mientras más rápido se baje en pH, más nutrientes serán retenidos en el silo, siendo primordial promover el crecimiento de las BAL lo más rápido posible después de sellarlo (Ashbell y Weinberg, 1999 y Schroeder, 2004).

La calidad del forraje de maíz en Colombia varía con respecto a las eco-regiones debido a que en cada una existen diferentes factores climáticos, edáficos y bióticos que inciden en la composición de la planta, su crecimiento y las bacterias epífitas que la habitan (Weiss, 1996 y Bernal, 1994). Por lo tanto, es de esperarse que este proceso se desarrolle diferente para el forraje de cada clima.

Debido a estos factores, se buscó identificar los géneros de BAL más representativos en el ensilaje de maíz sembrado en dos ecosistemas contrastantes (clima cálido y frío) su comportamiento a lo largo del proceso productivo y su efecto en la variación de la composición nutricional del forraje, con el fin de determinar, según las condiciones edafoclimáticas del cultivo, los géneros de BAL que colonizan cada sustrato, su comportamiento dentro del silo, y su efecto en la calidad del producto final.

### **Materiales y métodos**

El presente estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Nutrición Animal (Departamento de Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia) y de Microbiología (Departamento de Farmacia) de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

#### *Sustratos*

Maíz de clima cálido, variedad ICA Clavito blanco, sembrado en Villavicencio-Meta a una densidad de 190.000 plantas H<sup>-1</sup>, con período vegetativo al corte para ensilar de 75 días. En segunda instancia, maíz de clima frío variedad ICA 508 blanco, sembrado en la sabana de Bogotá a una densidad de 52.500 plantas H<sup>-1</sup>, con período vegetativo al corte para ensilar de 180 días. Ambos forrajes fueron cosechados en estado de grano pastoso (Jhonson et al., 2003, Cai et al., 1998 y Elizalde y Gallardo, 2003).

#### *Preparación de las muestras*

Se empleó un sistema de ensilaje a pequeña escala (Cai et al., 1999 y Ennahar et al., 2002) donde se empacaron 1.5 kg de cada material, picado en bolsas plásticas calibre seis de dimensiones 12" x 18" las cuales fueron selladas herméticamente. El silo de clima frío se almacenó a una temperatura promedio de 16 °C, mientras el de clima cálido a 37 °C, con el fin de simular las condiciones de temperatura propias para cada variedad.

#### *Calidad nutricional*

Se tomó una muestra por sustrato al inicio y al final del proceso y se le realizó: fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) por el método de Van Soest et al., (1991), digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), (Tilley y Terry, 1963), materia seca (MS) y proteína cruda (PC), según la metodología de la AOAC (1990) y azúcares reductores (Somogyi, 1952).

#### *Recuentos e identificación de flora microbiana del ensilaje*

Se tomaron tres muestras de cada sustrato en cada período de evaluación (días 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 28 y 56 de ensilaje) para determinar las concentraciones de los géneros de BAL epífitas, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, los cuales son los grupos más comúnmente aislados de ensilajes y los más representativos en el proceso fermentativo (Cai, 1999, Cai et al., 1999b y Masuko et al., 1995). Se utilizó el método de recuento en placa por siembra en profundidad (Swanson et al., 1992). Se hizo recuento de cada género de BAL (Vanderzant et al., 1992 y Kunz, 1986). Posteriormente, se realizaron pruebas de coloración de Gram, catalasa y oxidasa (Lindquist, 2001 y Zamora, 2005). Se aislaron las bacterias en tubos con caldo MRS y las cepas fueron conservadas en agar MRS. Se realizaron pruebas de crecimiento en anaerobiosis a 10, 30 37 y 45 °C y de crecimiento a 4, 6.5 y 7% de NaCl en el medio, producción de CO<sub>2</sub>, producción de D o L ácido láctico, reducción de nitrato, utilización de citrato y forma de crecimiento (Bergey's Manual, 1986, Teuber, 1993 y MacFaddin, 2003).

### Concentración de ácidos orgánicos

Se determinó la presencia de ácido acético y láctico en cada tratamiento mediante cromatografía de gases para cada día de evaluación (Leedle y Paulissen, 1989).

### Concentración de azúcares reductores

Se cuantificó para cada día en ambos tratamientos por medio de colorimetría (Somogyi, 1952).

### Análisis estadístico

Se empleó un diseño de parcelas divididas en el tiempo en el que la parcela principal fue el clima (para cada una de las poblaciones microbiales y el pH) y la subparcela los días de evaluación del silo. El valor de cada día, fue dado por el promedio de tres mediciones para cada tratamiento. Para establecer las concentraciones de ácido acético, láctico y azúcares reductores se utilizó un análisis de covarianza, con el clima como covariable para comparar las pendientes de las producciones de ácido en cada clima (SAS, 2004).

## Resultados

### Variación de pH dentro de los ensilajes

Se observó una reducción del pH para ambos tratamientos, siendo más rápida para el silo de clima cálido y estabilizándose antes que el de clima frío. Este comportamiento influyó tanto en la calidad como en el comportamiento de las BAL dentro del silo. Sin embargo, entre los tratamientos, no se encontraron diferencias significativas en el pH inicial ni final ( $p=0.1812$  y  $p=0.7863$  respectivamente) (Figura 1).

Se encontraron diferencias significativas en el pH para la interacción clima\*día ( $p<0.05$ ) indicando una tasa de disminución en el valor de pH diferente para cada clima, de tal forma que a partir del primer día y hasta el día siete, existió una disminución significativamente más rápida del pH para el clima cálido ( $p<0.05$ ), que concuerda con la mayor cantidad de azúcares utilizados por las bacterias de este tratamiento y ligada a un incremento en la concentración de ácido láctico en los primeros días y por lo tanto, una caída más pronunciada del pH. A partir del día siete y hasta el final del proceso no se presentaron diferencias entre tratamientos.

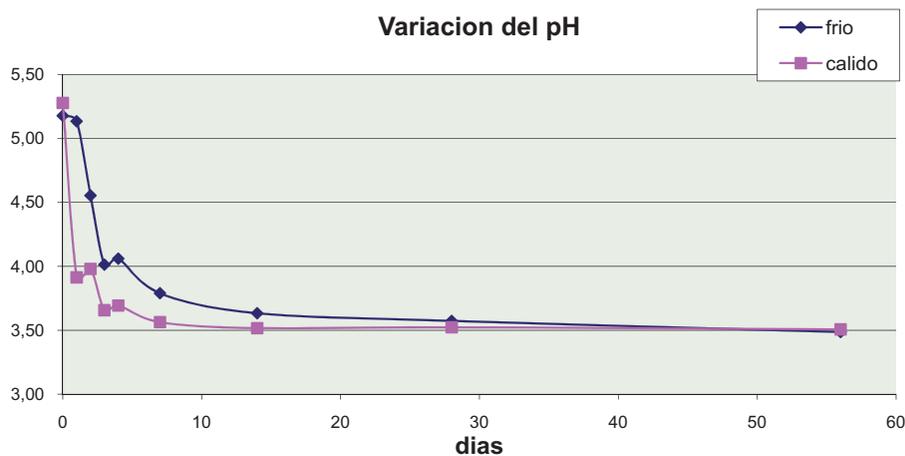


Figura 1. Variación del pH para silos de maíz a través del tiempo.

### Variación de poblaciones microbianas a lo largo del ensilaje

**Lactobacilos.** Se observaron diferencias significativas en la concentración de lactobacilos para la interacción del clima\*día ( $p<0.05$ ). Aunque no hubo diferencias en su concentración para el día

cerro, el primer día de ensilaje comenzó a mostrar una tendencia de mayor concentración en el silo de clima cálido ( $p= 0.07$ ) que para el día dos ya fue significativa ( $p<0.05$ ). Sin embargo, para el día siete la diferencia fue significativamente mayor en el silo de clima frío ( $p<0.05$ ). Posteriormente, no se observaron diferencias (Figura 2).

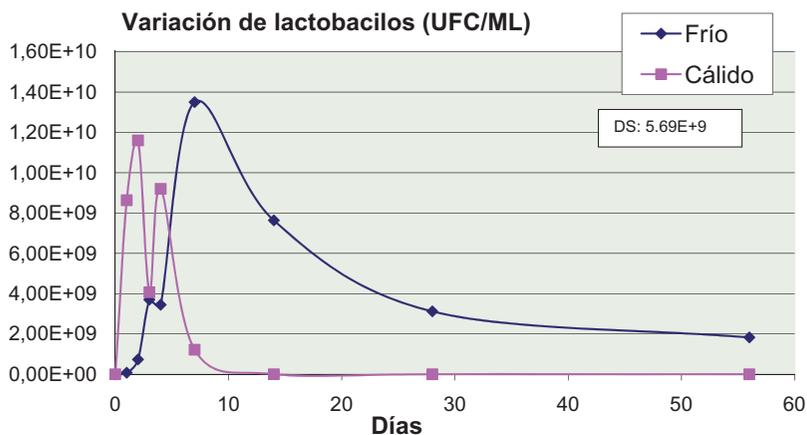


Figura 2. Variación de lactobacilos en el tiempo (UFC/ml).

*Pediococos*. Se observaron diferencias significativas en la interacción clima\*día ( $p < 0.05$ ) indicando que la población de pediococos fue diferente para cada clima a lo largo del tiempo. La tendencia de crecimiento para lactobacilos fue similar en los pediococos (Figura 3), sin embargo, para el silo de clima cálido, se observó una

tendencia de aumento en su concentración en el día dos mayor que para el silo de clima frío ( $p = 0.080$ ), que para el tercer día ya fue significativa ( $p < 0.05$ ). Posteriormente, para el día siete la tendencia de mayor crecimiento fue para el silo de clima frío ( $p = 0.0564$ ), concordante con las variaciones en el pH dentro de cada tratamiento.

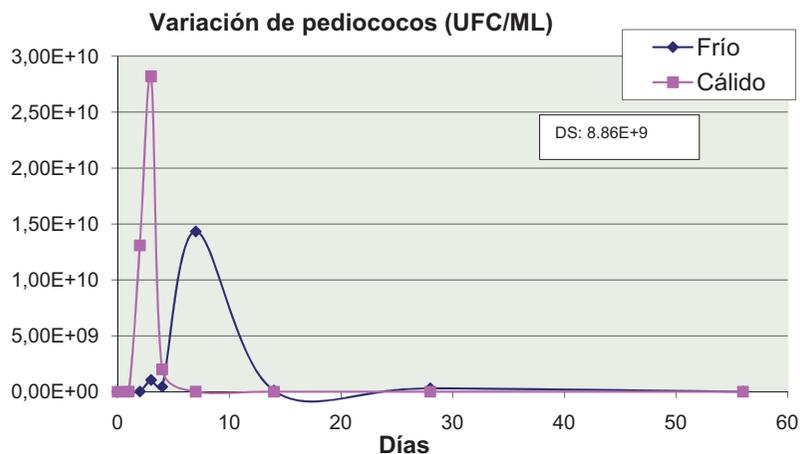


Figura 3. Variación de Pediococos en el tiempo (UFC/ml).

*Leuconostoc*. La interacción clima\*día mostró una tendencia de mayor crecimiento para el clima cálido ( $p = 0.0526$ ), que no fue significativa, indicando una tasa de crecimiento similar de este género para ambos tratamientos. En el silo de clima cálido el género *Leuconostoc* mostró una tendencia de crecimiento más rápida que para el clima frío (Figura 4), siendo estadísticamente significativa sólo hasta el día cuatro ( $p < 0.05$ ). Posteriormente no se observaron diferencias entre los tratamientos.

*Enterococos*. Se encontraron diferencias significativas para la interacción clima\*día ( $p < 0.05$ ), indicando que la población de enterococos fue diferente para cada clima a lo largo del tiempo. Aunque las poblaciones iniciales para ambos climas fueron similares, para el día uno, la población de clima cálido fue significativamente mayor que para el frío ( $p < 0.05$ ) (Figura 5).

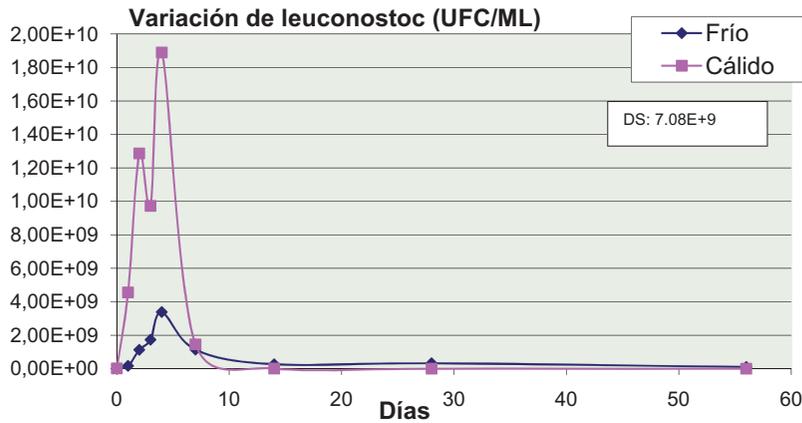


Figura 4. Variación de Leuconostoc en el tiempo (UFC/ml).

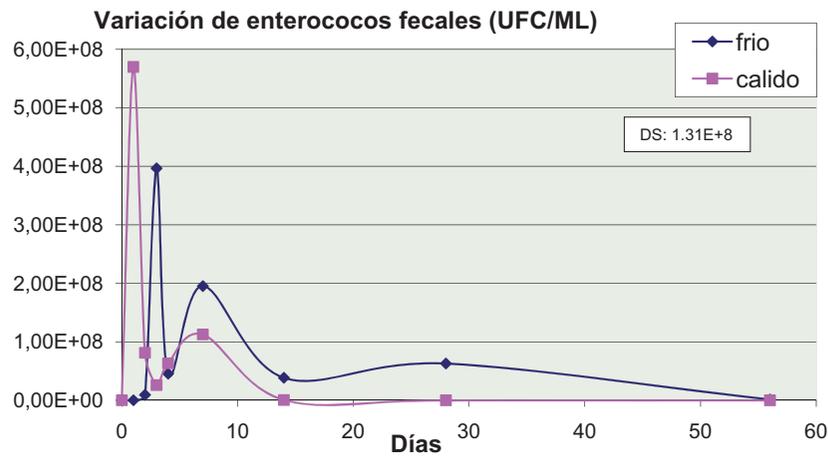


Figura 5. Variación de Streptococos en el tiempo (UFC/ml).

*Producción de ácidos orgánicos dentro de los silos*

**Ácido acético.** No se observaron diferencias significativas para el aumento en la concentración de ácido acético ( $p= 0.44$ ), siendo similar la producción de este ácido en los dos climas. Sin embargo, hubo diferencias significativas para la

variación del ácido ( $p<0.05$ ), mostrando un aumento constante en su concentración desde el momento de realización de los silos y hasta la estabilización, la cual fue alrededor del día tres de iniciado el proceso de ensilaje. Posterior a este día la concentración de ácido acético no presentó variación (Figura 6).

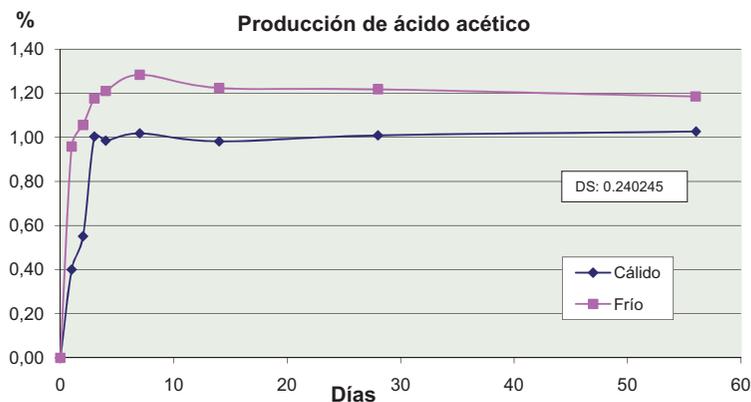


Figura 6. Producción de Ácido acético (% de la MS) en silos de maíz .

**Ácido Láctico.** No se observaron diferencias significativas para el aumento en la concentración del ácido láctico ( $p= 0.49$ ), esto indica una tasa de producción similar para ambos climas a lo largo del tiempo y hasta finalizado el proceso fermentativo. A pesar que se encontraron diferencias significativas para la variación del ácido a través de las mediciones realizadas en el tiempo ( $p<0.05$ ), con un aumento constante en su concentración desde el día uno de ensilaje y hasta el final del proceso, que para el día 56 no se había alcanzado a estabilizar (Figura 7).

**Concentración de azúcares reductores dentro de los silos.**

No se observaron diferencias significativas en la disminución de la concentración de azúcares entre los tratamientos ( $p=0.35$ ), pero si, para la concentración de azúcares a lo largo del tiempo en ambos climas ( $p<0.05$ ), esto indica que las bacterias colonizadoras de los silos, utilizaron efectivamente los azúcares de los forrajes desde el primer día y hasta terminado el proceso (Figura 8).

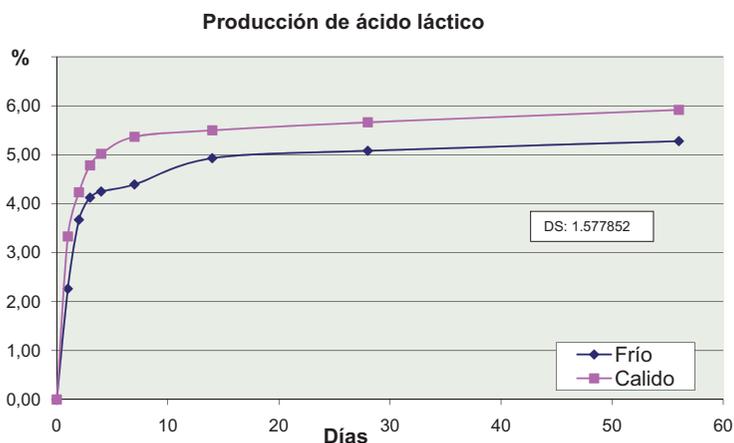


Figura 7. Producción de ácido láctico (% de la MS) en silos de maíz.

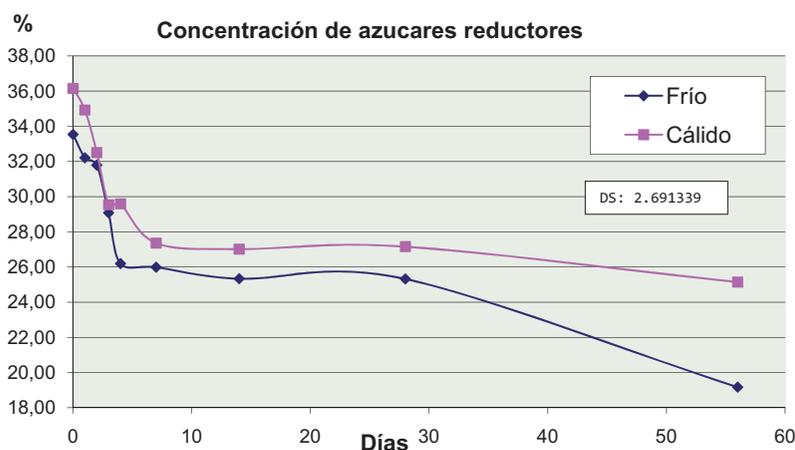


Figura 8. Azúcares reductores en silos de maíz (% de la MS).

*Calidad nutricional del forraje y el silo.*

No se presentaron diferencias entre el forraje y el silo al final del proceso en cada clima (Tabla 1). Sin embargo, el maíz de clima cálido presentó menor proteína, digestibilidad, minerales y una mayor concentración de MS, FDN y FDA que el de clima frío.

Tabla 1. Calidad nutricional (%) de forrajes y ensilajes de maíz.

Clima	Día	MS	FDN	FDA	DIVMS	PC	CEN
Frio	0	24.2	53.2	31.6	74.8	10.5	7.6
	56	24.0	49.8	31.9	78.9	10.9	8.2
Cálido	0	29.3	60.7	35.2	64.3	7.1	4.2
	56	29.0	60.1	35.7	65.5	7.8	3.7

## Discusión

pH a pesar de las condiciones climáticas en las que se desarrolló cada especie forrajera ensilada, el pH fluctuó en un pequeño rango poco variable, siendo consecuente con los resultados de la literatura (Sparo y Mallo, 2001). Así mismo, las condiciones de anaerobiosis, humedad y concentración de carbohidratos fueron adecuadas para que el pH descendiera a un nivel óptimo para la preservación de los silos en ambos tratamientos. De otro lado, posiblemente, la mayor cantidad de azúcares disponibles y la temperatura, para el forraje de clima cálido, permitió un tiempo Lag (de adaptación) más corto y un crecimiento exponencial más rápido, por lo tanto, estas bacterias produjeron mayor cantidad de ácido láctico en menor tiempo, generando una caída más pronunciada del pH para este tratamiento; esto favorece la calidad del material ensilado, gracias a una mayor velocidad de crecimiento con menor tiempo de duplicación por una mayor actividad metabólica. El pH final obtenido para ambos tratamientos (día 56), fue más bajo que el reportado por la literatura para ensilaje de maíz en Argentina sin la utilización de aditivos, el cual sólo alcanzó un valor de 4.1 después de 50 días de fermentación (Sparo y Mallo, 2001).

*Bacterias ácido lácticas* este grupo de bacterias presentaron, un crecimiento adecuado entre 25 y 40 °C con un óptimo de 35 a 37 °C (D'mello, 2002), por lo tanto la temperatura del clima cálido probablemente, influyó para un mayor crecimiento de las BAL en este clima. Es aquí donde las BAL epífitas juegan un papel primordial en la fermentación del ensilaje; su concentración dentro del silo se convierte en un factor importante para la predicción de un buen proceso fermentativo (Lin et al., 1992). Las concentraciones de bacterias encontradas para el día cero en ambos climas, demuestran las altas poblaciones de bacterias epífitas que posee el maíz en estas condiciones y que al momento de ensilar sirven de guía para decidir si se utilizará o no algún tipo de inoculante bacteriano en pro de asegurar una adecuada fermentación.

*Lactobacilos* las concentraciones iniciales de este género dentro de ambos silos se ubicaron en

un rango más alto que el reportado por la literatura y que para forraje de maíz varía entre  $3E+05$  y  $4.3E+07$  UFC/g (29, 30),  $3E+05$  para sorgo,  $1E+03$  UFC/g para ryegrass (Cai et al., 1999a) y  $8E+02$  UFC/g para alfalfa (Bolsen et al., 1992). En el presente estudio, las altas poblaciones iniciales de lactobacilos proporcionaron una ventaja al momento de la colonización del silo que ayudó a que en ambos ensilajes se desarrollara una fermentación adecuada. El mayor crecimiento de estas bacterias en el silo de clima cálido fue debido a que, a pesar de comenzar el proceso con una población similar, las condiciones de temperatura fueron más propicias para un buen crecimiento de los lactobacilos. Estas bacterias, mesófilas en su mayoría, se desarrollan idealmente a temperaturas entre 30 y 37 °C (Fornachon et al., 1940) con excepción de algunos termófilos como el *Lactobacillus helveticus* y el *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* (Kandler et al., 1986). Por el contrario, los periodos de crecimiento exponencial y de muerte celular fueron más largos para el silo de clima frío, debido principalmente a que el proceso de reducción en el pH fue mucho más lento, gracias a lo cual las bacterias de este silo pudieron contar con mayor tiempo para realizar los procesos adaptativos propios de su metabolismo y así mantener su pH interno en niveles cercanos a la neutralidad por mayor tiempo que los de clima cálido (Hutkins, 1993).

*Pediococos* las variaciones en esta población fueron similares a las presentadas y discutidas anteriormente para los lactobacilos, así mismo, las diferencias encontradas fueron por causas similares. Las concentraciones halladas en este trabajo se encuentran por encima de los reportes de la literatura, lo cual permite generar los beneficios fermentativos mencionados previamente dentro del silo. En maíz para ensilar se reportan concentraciones de  $1E+03$  y de  $8E+03$  UFC/g (Cai et al., 1998 y Cai et al., 1999b) y en ryegrass (*Lolium perenne*) de  $5E+03$  UFC/g (Cai et al., 1999a).

*Leuconostoc* este género es menos resistente al descenso del pH que los lactobacilos, especialmente por su alta susceptibilidad al ácido láctico en su forma no disociada (McDonald et al., 1990). Por lo tanto, su población comenzó a disminuir mucho más rápido en el tiempo que la de los otros géneros

evaluados en ambos tratamientos. Como sucedió para las otras BAL, la reducción poblacional de este género en clima frío fue más lenta por su posibilidad de adaptación al nuevo pH. Este género es el más común en el forraje fresco de alfalfa (*Medicago sativa*) y el segundo más común en guinea (*Panicum maximum*) con concentraciones de  $7E+05$  y  $8E+03$  UFC/g respectivamente (Cai, 1999), los cuales, a pesar de ser valores mucho más bajos que los encontrados en el presente estudio, concuerdan en ser la población dominante en ambos tratamientos, ya que este género presentó la mayor concentración de UFC/g en el forraje fresco con respecto al total de las BAL. Varios investigadores han reportado valores iniciales de  $8E+06$  hasta  $5E+07$  UFC/g en forraje de maíz (Cai et al., 2003 y Cai et al., 1999a), similares a los valores encontrados en el presente estudio. Este género cumple una importante función inicial en la búsqueda del rápido descenso del pH dentro del silo. Por lo tanto, las altas poblaciones iniciales encontradas en este trabajo, contribuyeron efectivamente, al descenso del pH en sus etapas iniciales reduciendo así las pérdidas dentro del silo.

*Enterococos* varios grupos han reportado datos similares a los encontrados en este estudio, los cuales afirman que las condiciones de temperatura de clima cálido son más propicias para el rápido desarrollo de este género (D'mello, 2002 y Ohmomo et al., 2004). Para el día tres, la población de bacterias de clima frío superó significativamente a las de clima cálido ( $p < 0.05$ ) ya que, las bacterias de clima frío tuvieron la posibilidad de adaptarse a las nuevas condiciones de pH por las condiciones discutidas anteriormente. Sin embargo, a diferencia de las otras BAL, estas bacterias se encuentran dentro de las poblaciones ácido lácticas más susceptibles a pH bajos (Cai, 1999 y Bergey's manual, 1986) Esto se reflejó en el presente estudio, ya que las poblaciones de enterococos (junto con los leuconostoc) fueron las que más rápidamente comenzaron a reducir su población siendo más crítico este descenso para el clima cálido a partir del segundo día de ensilaje (Figura 5).

Para maíz, sorgo, alfalfa y ryegrass se han reportado concentraciones de  $3E+05$ ,  $6E+05$ ,  $1E+04$  y  $5E+04$  UFC/g respectivamente de enterococos (Cai

et al 1999a), mientras que para alfalfa los valores iniciales son de  $5E+05$  UFC/g (Jones et al., 1991). Cai et al., (1998) midieron concentraciones de  $9E+04$  y  $5E+03$  UFC/g para forrajes de maíz y sorgo respectivamente. Las concentraciones encontradas en el presente estudio están en el rango superior de los reportes de literatura, reafirmando el potencial microbiológico existente en nuestros ecosistemas.

#### *Producción de ácidos orgánicos*

*Ácido acético.* La concentración de este ácido para ambos climas fue menor que la reportada por Rot (2001) y Davies et al., (1998) cercana al 2.5% para silo de maíz con humedad del 70% y de 3% para silo de ryegrass. Danner et al., (2003) por su parte, reportaron valores de 1.7% para silo de maíz, siendo también menores que los datos encontrados en este estudio, pero similares a los reportados por este mismo grupo en silos inoculados con bacterias homofermentadoras (0.96%) y bastante menor que en silos inoculados con bacterias heterofermentadoras (2.8%). Esto indica que para el presente estudio hubo una predominancia de bacterias homo sobre las heterofermentativas que evitó la producción de ácido acético en altas cantidades para ambos climas. Sin embargo, algunos autores (Danner et al., 2003 y Kung, 2001), coinciden en que las bajas concentraciones finales de ácido acético son la causa principal para una baja estabilidad aeróbica del silo, debido, entre otras causas, al predominio de levaduras, las cuales son bastantes susceptibles a este ácido, el cual, al presentar bajas concentraciones dentro del silo, no ayudó en el control de estos microorganismos.

La rápida estabilización en la producción de este ácido para ambos tratamientos, indica una disminución en las poblaciones de bacterias productoras del mismo, especialmente enterobacterias y algunas poblaciones de BAL heterofermentativas. Por lo tanto, la reducción de estas poblaciones fue debida a la acidificación del medio por los ácidos producidos, ya que tanto las enterobacterias como muchas de las BAL heterofermentadoras (especialmente las del género Leuconostoc), son susceptibles a pH menores de cinco (D'mello, 2002; Schroeder 2004 y McDonald et al., 1990).

*Ácido Láctico* el aumento constante en la producción de este ácido, sugiere que incluso a condiciones extremas de pH (final del proceso fermentativo), pudieron existir algunas especies de bacterias lácticas con capacidad para continuar fermentando el sustrato, algunas de las cuales podrían cumplir los requisitos mínimos para ser empleadas como aditivos biológicos en ensilajes. La concentración final de ácido láctico para clima frío, fue similar a los reportados en la literatura de 5.21% (Xiccato *et al.*, 1994) y en general para ambos tratamientos se encontraron dentro de los rangos reportados para ensilajes de maíz con un porcentaje de materia seca entre 23 y 38% de 8.1% hasta 4.7% de ácido láctico respectivamente (Sutton *et al.*, 2000).

Por otro lado, se han reportado valores de 1.7% de ácido láctico en maíz ensilado a 37 °C y 2.8% cuando la temperatura de ensilaje fue de 28 °C (Weinberg *et al.*, 2002), mucho más bajos que los encontrados en este estudio. En una revisión sobre reportes de análisis fermentativos en silos de maíz se reportan valores de ácido láctico que varían desde cuatro hasta 7% de la materia seca (Kung and Shaver, 2001). Los valores de ácido láctico encontrados en el presente trabajo se encuentran dentro de los rangos que presenta la literatura como adecuados y está altamente correlacionada con un buen proceso fermentativo del forraje (Kung and Shaver, 2001 y Schroeder, 2004). Estos valores unidos a la baja producción de ácido acético, confirman el dominio de las bacterias homofermentativas en ambos ensilajes.

#### *Concentración de azúcares reductores.*

La cantidad de azúcares utilizados por las bacterias no presentó diferencias entre los tratamientos. Estos datos son coherentes con la reducción en el pH y con la producción de ácido láctico, ya que los azúcares son la principal fuente de energía para las BAL y por lo tanto, el sustrato para la producción de ácido láctico con la consecuente disminución del pH. Aunque no se encontraron diferencias en la concentración de azúcares dentro de los silos a lo largo del proceso, como porcentaje del total de azúcares, se observó

una mayor utilización de estos por las bacterias de clima frío (14.37% del total de azúcares vs 11% en el silo de clima cálido), esto es debido a que la disminución más lenta del pH en el silo de clima frío, permitió un proceso fermentativo mas largo, el cual se realiza a partir de la utilización de los azúcares por las BAL (Figura 8).

Stokes (1992) reporta una concentración mínima de carbohidratos solubles del 12% de la MS para asegurar una adecuada fermentación. Por lo tanto, los forrajes evaluados cumplen ampliamente este requerimiento mínimo inicial. Han sido reportados valores de almidones en maíz para ensilar que varían entre el 29 al 41% de la MS dependiendo del estado fisiológico en el cual se realiza la cosecha (Desde grano lechoso hasta grano seco) (Andrae *et al.*, 2001). Así mismo, otros autores, encontraron entre 28.7 y 37.2% para 1/4 y 2/3 de la línea de leche respectivamente (Johnson *et al.*, 1999).

Aunque los datos analizados en este trabajo son de los azúcares reductores contenidos en los forrajes y no de almidones como tal, se debe tener en cuenta que la mayor concentración de estos azúcares en el maíz en estado de grano lechoso a pastoso se encuentran en forma de almidón (Johnson *et al.*, 2003), por lo tanto, estos valores sirven como referencia para los valores encontrados. En la literatura se reportan valores de almidones al finalizar el proceso de ensilaje entre el 18 y 38% de la MS (Johnson *et al.*, 2003).

Para el presente estudio se encontraron valores cercanos al límite inferior de este rango. Mientras que otros estudios reportan valores entre 23.2 y 25.8% de almidón, para silos de maíz tratados con amonio y ácido propiónico a los 106 días de fermentación (Kung *et al.*, 2000), los cuales son muy cercanos a los datos finales del silo de clima cálido en este estudio. Las concentraciones de azúcares encontradas en el presente estudio concuerdan con los reportes de literatura, indicando que el cultivo fue cosechado en su estado óptimo para ensilar y el proceso fermentativo se produjo como se esperaba para un buen ensilaje.

### *Calidad nutricional del forraje y el ensilaje de maíz*

Los resultados encontrados en el presente estudio, indican un excelente proceso fermentativo que certifica la eficiencia de las BAL epífitas en ambos climas para la conservación de la energía dentro del silo y la excepcional calidad del forraje de maíz para ser ensilado. A pesar de que la humedad en ambos forrajes fue mucho mayor que la recomendada por la literatura, especialmente en el forraje de clima frío, esto no fue obstáculo para que el proceso fermentativo se llevara a cabo de una manera adecuada, indicando que aunque este es un factor importante en la confección de ensilajes, no es el punto más crítico dentro del proceso, ya que si se cuenta con un buen nivel de anaerobiosis, una alta concentración de azúcares fermentables y una población de BAL epífitas alta, el proceso fermentativo se llevará a cabo sin mayores contratiempos. Según estos resultados, se comprueba que siempre y cuando se cumplan las condiciones planteadas, no será necesario el uso de aditivos microbianos para la confección de silo de maíz, ya que las BAL epífitas, serán suficientes para realizar el proceso fermentativo necesario para alcanzar la estabilidad del silo.

### Referencias

- Andrae JG, Hunt CW, Pritchard GT, Kennington LR, Harrison JH, Kezar W, Mahanna W. Effect of hybrid, maturity, and mechanical processing of corn silage on intake and digestibility by beef cattle. *J Anim Sci* 2001; 79:2268-2275.
- AOAC. Official methods of analysis. Vol. 1. 15th ed. Assoc. Ofic.. Anal. Chem, Arlington, va. 1990.
- Ashbell G, Weinberg ZG. FAO. Conferencia electrónica en forrajes tropicales. Estudio 7.0 - ensilaje de cereales y cultivos forrajeros en el trópico. 1999; (4/02/08) URL: [Http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/agp/agpc/gp/silage/home.htm](http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/agp/agpc/gp/silage/home.htm).
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1st Edition. John G. Holt, Editor-in-Chief. Williams & Wilkins, Baltimore 1986.
- Bernal EJ. Pastos y forrajes tropicales. Producción y manejo. Tercera edición. Banco ganadero. Santa fe de Bogotá. Colombia. 1994.
- Bolsen KK, Lin C, Brent BE, Feyerherm AM, Urban JE, Aimutis WR. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. *J Dairy Sci* 1992; 75:3066-3083.
- Cai Y, Benno Y, Ogawa M, Kumai S. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *J Dairy sci* 1999b; 82:520-526.
- Cai Y, Benno Y, Ogawa M, Ohmomo S, Kumai S, Nakase T. Influence of lactobacillus spp. From an inoculant and of weissella and leuconostoc spp. *Appl Environ Microb* 1998; 64:2982-2987.
- Cai Y, Kumai S, Ogawa M, Benno Y, Nakase T. Characterization and identification of pediococcus species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Japan appl environ microb* 1999a; 65:2901-2906.
- Cai Y. Identification and Characterization of Enterococcus Species Isolated from Forage Crops and Their Influence on Silage Fermentation. *J Dairy Sci* 1999; 82:2466-2471.
- Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, Braun R. Acetic Acid Increases Stability of Silage under Aerobic Conditions. *Appl Environ Microb* 2003; 69:562-567.

Los actuales cultivos de maíz en clima cálido y frío de Colombia, presentan una alta concentración de BAL epífitas que permiten desarrollar un buen proceso fermentativo del ensilaje, estas bacterias representan un alto potencial en nuestros forrajes tropicales de maíz que podrían ser potencialmente usados como aditivos biológicos para ensilaje. Por su parte, las condiciones edafoclimáticas características de las zonas en donde se produjeron los silos, influyeron sobre los estados iniciales de formación de ácidos orgánicos, siendo las condiciones de clima cálido más propicias para un rápido descenso del pH dentro del silo, sin embargo, la rápida colonización por las BAL en el sustrato de ambos climas y el descenso en el pH, evitó el crecimiento de otras especies de bacterias indeseables para el objetivo de alcanzar un producto final de la mejor calidad. Los resultados encontrados en el presente estudio tienen gran aplicación en el proceso de preservación de ensilajes en nuestro país.

### Agradecimientos

Al personal de los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Farmacia y de Nutrición Animal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá y al personal del laboratorio de Corpoica Tibaitatá en Mosquera, Cundinamarca.

- Davies DR, Merry RJ, Williams AP, Bakewell EL, Leemans DK Tweed Jk. Proteolysis during ensilage of forages varying in soluble sugar content. *Nutrition, feeding, and calves*. 1998; 81:444-453.
- D'mello JP. Microbiology of animal feeds. Edinburgh eh9 3jg, united kingdom. 2002. (24/03/09) URL : [Http://www.fao.org/docrep/article/agrippa/556\\_en.htm](http://www.fao.org/docrep/article/agrippa/556_en.htm).
- Elizalde H, Gallardo M. evaluación de ensilajes de avena y cebada en la ganancia de peso de vaquillas en crecimiento. *Agricultura técnica (chile)* 2003; 63:380-386.
- Ennahar S, Cai Y, Fujita Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16s ribosomal dna analysis. *National institute of livestock and grassland science*, 2002. 329-2793, Japan.
- Food and alimentation organisation (FAO). 1999. Electronic conference on tropical silage grassland and pasture crops ;(21/07/08) URL : <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/agp/agpc/gp/silage/home.htm>
- Fornachon J., Douglas H. And Vaughn R. 1940. The ph requirements of some heterofermentative species of *Lactobacillus*. Division of fruit products, University of California, Berkeley, California.
- Hutkins R, Nannen N. pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *J Dairy Sci* 1993; 76:2354-2365.
- Johnson L, Harrison JH, Hunt C, Shinnors K, Doggett CG, Sapienza D. Invited Review. Nutritive Value of Corn Silage as Affected by Maturity and Mechanical Processing: A Contemporary Review. *J Dairy Sci* 1999; 82:2813-2825.
- Johnson LM, Harrison JH, Davidson D, Mahanna WC, Shinnors K. Corn Silage Management: Effects of Hybrid, Maturity, Inoculation, and Mechanical Processing on Fermentation Characteristics. *J Dairy Sci* 2003; 86:287-308.
- Jones BA, Muck RE, Ricke SC. Selection and Application of *Streptococcus bovis* as a Silage Inoculant. *Appl Environ Microb* 1991; 57:3000-3005.
- Kandler O, Wiss N. Berguey's manual of systematic bacteriology Vol.2. Pages 1208-1234 Williams and Wilkins Press, Baltimore. 1986.
- Kung L, Robinson JR, Ranjit NK, Chen JH, Golt CM, Pesek JD. Microbial Populations, Fermentation End-Products, and Aerobic Stability of Corn Silage Treated with Ammonia or a Propionic Acid-Based Preservative. *J Dairy Sci* 2000; 83:1479-1486.
- Kung L, Shaver R. Interpretation and Use of Silage Fermentation Analysis Reports. *Focus on Forage* 2001; 3 :1-5.
- Kung L. Silage fermentation and additives. *Direct -fed Microbial, Enzyme & Forage Additive Compendium*, Miller Publishing Co.,Minnetonka, 2001.
- Kunz B. cultivo de microorganismos para la producción de alimentos. Ed, acribia. Zaragoza. p.125. 1986.
- Leedle PJ, Paulissen J. Factors affecting the in Vitro production of VFA by mixed bacterial population from the bovine rumen. *J animal Sci*. 1989; 67:1593-1602.
- Lin C., Bolsen KK., Brent BE, and Fung DYC. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J Applied Bacteriol* 1992; 73:375-387.
- Lindquist J. An Introduction to Bacterial Identification Page 1: General Principles. 2001 (23/11/08) URL : [www.jlindquist.net](http://www.jlindquist.net).
- MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas individuales. Capitulo 1. En Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 2003.
- Mahecha L, Gallego LA. Situación actual de la ganadería de carne en Colombia y alternativas para impulsar su competitividad y sostenibilidad. *Rev Col Cienc Pec* 2002; 15:213-225.
- Masuko T, Kitajima F, Okada S, Uchimura T. Effects of inoculation with *Lactobacillus casei* Subsp *Rhamnosus* at ensiling on fermentation and flora of lactic acid bacteria of grass silages. *J Dairy Sci* 1995; 54:45-51.
- McDonald LC, Fleming HP, Hassan HM. Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl Env Microb*. 1990; 56:2120-2124.
- Ohmomo S, Odaï M, Pholsen P, Nitisinprasert S, Kraykaw D, Hirampradit S. Effect of a Commercial Inoculant on the Fermentation Quality of ABP Silage in Thailand. 2004. *JARQ* 38, 125-128.
- Roth GW. Corn Silage Production and Management. The Pennsylvania State University. Produced by information and Communication Technologies in the College of Agricultural Sciences. 2001. CAT UC079 5M11/01ps3141.
- SAS. Licencia de la Universidad Nacional de Colombia. Programa glm para el análisis de varianza y de covarianza. 2004.
- Schroeder JW. Silage fermentation and preservation. 2004; (05/09/08) URL: [Http://www.ext.nodak.edu/extpubs/ansci/dairy/as1254w.htm](http://www.ext.nodak.edu/extpubs/ansci/dairy/as1254w.htm).
- Somogyi M. Notes on sugar determination. *The J biol chem* 1952. 195:19-23.
- Sparo MD, Mallo RA. Evaluation of the bacterial flora in natural corn silage. *Rev Argent Microbiol*. 2001; 33:75-80.
- Stokes MR. Effects of an Enzyme Mixture, an Inoculant, and Their Interaction on Silage Fermentation and Dairy Production. *Nutrition, Feeding and Calves*. *J Dairy Sci* 1992; 75:764-773.
- Sutton JD, Cammell SB, Phipps RH, Beever DE, Humphries DJ. The effect of crop maturity on the nutritional value of maize silage for lactating dairy cows 2. Ruminal and post-ruminal digestion. *British Soc Anim Sci*. 2000; 71:391-400.
- Swanson KM, Busta FF, Peterson EH, Johnson MG. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Third edition. American Public Health association. Washington D.C. U:S.A. 1992.

- Teuber MA. Lactic acid bacteria. In: Biotechnology. Rehm J, Reed G, Puhler A, Stadler P. Eds. 1993. vol. 1, pp. 326-365.
- Tilley JM. and Terry RA. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J Brit Grass Soc* 1963; 18:104-111.
- Van Soest PJ., Robertson JB. and Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.*1991; 74:3583.
- Vanderzant C, Splittstoesser DF. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. cap. 25, 1219p.
- Weinberg ZG, Asbell G, Hen Y, Azrieli A, Szakacs G. Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J Ind Mic Biotech* 2002; 28:17-11.
- Weiss B. When to consider silage additives. Tri-state dairy nutrition conference. Ohio State University. Department of Animal Science. 1996. p.125-135.
- Xiccato G, Cinetto A, Carazzolo B, Cossu M. The effect of silo type and dry matter content on the maize silage fermentation process and ensiling loss. *Anim Feed Sci Tech.* 1994; 49:311-323.
- Zamora RL. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis Doctoral. Universidad de Girona. Instituto de tecnología agroalimentaria. 2005.