

**EVALUACIÓN DEL CONTENIDO RUMINAL COMO SUPLEMENTO
ALIMENTICIO PARA EL CONSUMO DE GANADO BOVINO ENSILÁNDOLO
CON *Lactobacillus casei***

DIANA ACEVEDO MONTOYA

LUISA FERNANDA BUITRAGO ARTEAGA

UNIVERSIDAD EAFIT

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2008

**EVALUACIÓN DEL CONTENIDO RUMINAL COMO SUPLEMENTO
ALIMENTICIO PARA EL CONSUMO DE GANADO BOVINO ENSILÁNDOLO
CON *Lactobacillus casei***

DIANA ACEVEDO MONTOYA

LUISA FERNANDA BUITRAGO ARTEAGA

**Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniero de Procesos**

Asesora: MRes. Valeska Villegas

Ingeniera Química MRes. Biotecnología

Universidad EAFIT

Coasesor: Zootecnista Juan Manuel Cerón

COOPERATIVA COLANTA

UNIVERSIDAD EAFIT

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS

MEDELLÍN

2008

Nota de aceptación

Firma Presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, Enero 24 de 2008

*A Dios, que siempre nos dio las fuerzas
necesarias para seguir adelante en los
momentos difíciles, a nuestros padres por
habernos acompañado en todos los momentos
importantes de la carrera, por haber sido
nuestros guías durante este proceso de
aprendizaje, y a nuestros profesores por
compartir sus experiencias y conocimientos.*

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a las personas que colaboraron en el desarrollo del proyecto de grado:

Valeska Villegas Escobar. Ingeniera Química MRes. Biotecnología. Coordinadora del Departamento de Biotecnología y Profesora de Ingeniería de Procesos en la Universidad EAFIT.

Juan Manuel Cerón. Zootecnista. Asistente técnico de la Cooperativa Colanta.

Sigifredo Cárdenas. Auxiliar del laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT.

Personal de los laboratorios de Ingeniería de Procesos, Edgar Arbeláez y Jhon Jairo Estrada.

Cooperativa Colanta, especialmente a Francisco Uribe, Ignacio Gutiérrez y Santiago Berrío.

Guillermo Buitrago Gómez. Ingeniero Agrónomo. Representante técnico comercial en Yara Colombia Ltda.

Diego Suárez. Ingeniero de Procesos, Universidad EAFIT.

Olga Inés Montoya. Bióloga. Profesora de microbiología de la Universidad Nacional Sede Medellín.

CONTENIDO

	PÁG.
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	4
1.1. GENERAL.....	4
1.2. ESPECÍFICOS.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. RUMEN Y CONTENIDO RUMINAL	5
2.1.1. Estómago de los rumiantes.....	6
2.1.2. Fermentación ruminal.....	8
2.1.3. Microorganismos del rumen	9
2.1.4. Grupos metabólicos y algunos aislamientos ruminales.....	10
2.1.5. Impacto en el medio ambiente	13
2.2. ENSILAJE.....	13
2.2.1. Definición	13
2.2.2. Descripción del proceso de ensilaje	15
2.2.3. Bioquímica del ensilaje.....	16
2.2.4. Calidad del ensilaje	18
2.2.5. Evaluación de ensilajes.....	19
2.2.6. Tipos de silos	22
2.3. INOCULANTES	24
2.4. TECNOLOGÍA DE LA FORMULACIÓN	25
2.4.1. Emulsiones aceite en agua	26
3. DISEÑO METODOLÓGICO	28

3.1.	MATERIALES	28
3.2.	EQUIPOS	29
3.3.	UBICACIÓN	30
3.4.	PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	31
3.4.1.	Microorganismo	31
3.4.2.	Medio de cultivo	32
3.4.3.	Fermentación de <i>Lactobacillus casei</i>	33
3.4.4.	Métodos de medición	33
3.4.4.1.	<i>Medición de biomasa por densidad óptica</i>	33
3.4.4.2.	<i>Consumo de sustrato</i>	34
3.4.4.3.	<i>Tinción de Gram</i>	34
3.5.	DESARROLLO DE FORMULACIONES LÍQUIDAS	35
3.5.1.	Pruebas preliminares	35
3.5.2.	Proceso productivo de las formulaciones	36
3.5.2.1.	<i>Formulación líquida en agua</i>	36
3.5.2.2.	<i>Formulación líquida en aceite vegetal</i>	37
3.5.2.3.	<i>Formulación líquida en emulsión aceite en agua</i>	37
3.5.3.	Viabilidad de las formulaciones líquidas	37
3.6.	ENSILAJE DEL CONTENIDO RUMINAL	39
3.6.1.	Contenido ruminal	39
3.6.2.	Diseño metodológico	40
3.6.2.1.	<i>Primer proceso de ensilaje</i>	40
3.6.2.2.	<i>Segundo proceso de ensilaje</i>	41
3.6.3.	Análisis bromatológico	43
3.6.4.	Análisis estadístico	44
3.6.5.	Pruebas de consumo	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1.	PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	46
4.2.	DESARROLLO DE FORMULACIONES LÍQUIDAS	49

4.2.1. Pruebas preliminares	49
4.2.1.1. <i>Formulación líquida en agua</i>	49
4.2.1.2. <i>Formulación líquida en aceite</i>	50
4.2.1.3. <i>Formulación líquida en emulsión aceite en agua</i>	50
4.2.2. Viabilidad de las formulaciones líquidas.....	52
4.3. ENSILAJE DEL CONTENIDO RUMINAL	54
4.3.1. Primer proceso de ensilaje	54
4.3.1.1. <i>Análisis unifactorial del primer ensilaje</i>	54
4.3.2. Segundo proceso de ensilaje	58
4.3.2.1. <i>Análisis multifactorial del segundo ensilaje</i>	58
4.3.2.2. <i>Análisis unifactorial</i>	59
4.3.3. Pruebas de consumo	61
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	68
CIBERGRAFÍA	79

LISTA DE TABLAS

	PÁG.
Tabla 1. Características asociadas con el ensilaje de alta y baja calidad	19
Tabla 2. Caracterización organoléptica: color, olor, consistencia.	20
Tabla 3. Composición del medio de cultivo MRS.....	32
Tabla 4. Formulaciones líquidas con sus respectivos vehículos.....	38
Tabla 5. Diseño experimental unifactorial	41
Tabla 6. Porcentajes de inoculación para el producto comercial y la formulación líquida.	42
Tabla 7. Evaluación de la formulación con diferentes niveles de inoculación.....	43
Tabla 8. Características físicas y biológicas de las formulaciones líquidas.	51
Tabla 9. Porcentaje de reducción de cada formulación líquida a diferentes temperaturas.....	53
Tabla 10. Resultados de las características físicas y nutricionales del primer ensilaje.....	55
Tabla 11. Resultados de las características físicas y nutricionales del segundo ensilaje.....	59
Tabla 12. Resultados de las características físicas y nutricionales del segundo ensilaje bajo un diseño de experimentos unifactorial.....	60

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. El sistema digestivo de una vaca incluye cuatro estómagos.....	20
Figura 2. <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	32
Figura 3. Método de diluciones seriadas en placa.	38
Figura 4. Contenido ruminal proveniente de la planta de sacrificio de FrigoColanta.	39
Figura 5. Ensilaje del contenido ruminal.	40
Figura 6. Crecimiento celular y consumo de sustrato para <i>Lactobacillus casei</i> . ..	46
Figura 7. Formulaciones líquidas con <i>Lactobacillus casei</i>	51
Figura 8. Viabilidad de <i>L. casei</i> en diferentes formulaciones.	52
Figura 9. Pruebas de consumo en ganado bovino.....	62

LISTA DE ANEXOS

	PÁG.
ANEXO A. Tinción de Gram	81
ANEXO B. Determinación de azúcares por el método de DNS.....	83
ANEXO C. Cuadro de olores y colores.....	85
ANEXO D. Resultados de la fermentación.....	86
ANEXO E. Primer ensilaje, análisis unifactorial.....	87
ANEXO F. Segundo ensilaje, análisis multifactorial.....	97
ANEXO G. Segundo ensilaje, análisis unifactorial.....	106

RESUMEN

El contenido ruminal es un subproducto obtenido del sacrificio de ganado bovino y por tiempos ha sido arrojado a ríos y quebradas cercanas a los frigoríficos produciendo un alto impacto ambiental debido a la carga orgánica que este contiene. En algunos frigoríficos a la ruminaza se le ha dado un valor agregado como abono orgánico. Debido a su gran cantidad de flora y fauna microbiana, y a los nutrientes que contiene, la ruminaza puede ser considerada como un suplemento alimenticio para animales.

En esta investigación se evaluó otra alternativa de uso para la ruminaza, la cual consistió en ensilar este material con el fin de obtener un suplemento alimenticio para el ganado bovino y de esta forma aprovechar sus nutrientes.

En el ensilaje se evaluaron diferentes formulaciones líquidas con *Lactobacillus casei* basadas en agua, aceite y una emulsión agua – aceite. Después de obtener los resultados de este experimento se evaluó la formulación que arrojó los mejores resultados con diferentes dosificaciones en el ensilaje. Finalmente el contenido ruminal ensilado de este último ensayo se llevó a una finca lechera para realizar las pruebas de consumo en ganado bovino.

En los procesos de ensilaje realizados se midió pH, olor, color y se elaboraron análisis bromatológicos donde se evaluaron diferentes parámetros nutricionales como porcentajes de materia seca, humedad, proteína, cenizas, fibra en detergente ácido (FDA), y fibra en detergente neutro (FDN).

Aunque algunos de los parámetros a tener en cuenta en el proceso de ensilaje fueron óptimos como el pH, % FDA y % FDN, el contenido ruminal ensilado después de 35 días fue rechazado por el ganado bovino.

Palabras claves: Contenido ruminal, ensilaje, *Lactobacillus casei*, formulaciones líquidas.

INTRODUCCIÓN

El contenido ruminal también conocido como “ruminaza” es un subproducto originado del sacrificio de animales, se encuentra en el primer estómago del bovino en el cual al momento del sacrificio contiene todo el material que no alcanzó a ser digerido. Posee una gran cantidad de flora y fauna microbiana y productos de la fermentación ruminal, por esto se puede decir que es una alternativa para la alimentación de rumiantes, pollos y cerdos de engorde por sus características químicas, biológicas, bromatológicas y su amplia disponibilidad (Trillos *et al.*, 2007).

En la mayoría de las plantas de sacrificio del país, la producción del contenido ruminal alcanza anualmente unas 85000 toneladas (Cadavid, 2001), este es un índice alto de contaminación ya que se produce una alta carga orgánica en los efluentes, que por su forma de depósito llegan a fosas sépticas, basureros municipales y aguas residuales fomentando la contaminación. (Domínguez y Barajas, 1993; Ayala y Perea, 2000). Actualmente en la planta de sacrificio de Colanta (ubicada en el municipio de Santa Rosa de Osos) se están produciendo 40 toneladas diarias de contenido ruminal bovino, lo que implica un grave problema de manejo ambiental para la empresa.

El tratamiento de los subproductos originados del sacrificio de ganado bovino representa un problema serio debido a las estrictas reglamentaciones ambientales que se decretan por parte de las autoridades gubernamentales y de los entes creados para este control. Adicionalmente, los frigoríficos no han desarrollado soluciones adecuadas que les permita evacuar higiénicamente o subprocesar estos desechos. Algunas plantas de sacrificio, por años, han arrojado este material a los ríos y alcantarillados sin ninguna consideración sanitaria previa, lo que puede

ser perjudicial para la salud humana y, además, un grave problema ambiental (Colanta, 2007).

Actualmente, el contenido ruminal obtenido de la planta de sacrificio de Colanta, se está compostando. Después de un proceso de adición de agua y aire, el subproducto es transportado a otro depósito de la planta, donde se elimina aproximadamente un 70% del agua, y finalmente se le hace un proceso de compostaje. Esto se hace con el fin de evitar un problema de contaminación cruzada que se presenta al reunir este subproducto con el producto de interés.

El compostaje es una técnica que se realiza con el fin de darle un valor agregado al contenido ruminal convirtiéndolo en un abono orgánico para suelos gracias a la flora microbiana que contiene. El compostaje se aplica en suelos carentes de materia orgánica para mejorar sus condiciones físicas, especialmente en tierras áridas. En climas fríos como el de Santa Rosa de Osos, el material compostado se aplica con el fin de mineralizar los nutrientes y con la materia orgánica, mejorar la estructura del suelo haciéndolo más poroso y con mejor aireación (Colanta, 2007).

El ensilaje es una técnica que, aunque tiene un objetivo diferente al del compostaje, presenta algunas ventajas. Entre ellas, es un proceso más económico, ya que ensilar en bolsas de plástico no requiere de mucha maquinaria y mano de obra, por el contrario el compostaje requiere de grandes pilas que ocupan un gran espacio y además necesitan constantemente de una persona que esté realizando el volteo de estas. Además, el ensilaje tiene un valor agregado al convertir los forrajes en alimento para animales, que para los bovinos en crecimiento puede contener parte de los nutrientes necesarios para su desarrollo y se puede economizar parcialmente el costo de los alimentos concentrados.

Mediante el presente estudio se pretende analizar una nueva alternativa para el aprovechamiento de la ruminaza en la planta de sacrificio de Colanta (FrigoColanta), utilizando la técnica del ensilaje, teniendo en cuenta las variables a controlar en este proceso y, finalmente, evaluar este subproducto como un

suplemento alimenticio para el consumo de ganado bovino aprovechando los nutrientes que contiene.

Con este proyecto se busca otra fuente de alimentación para el ganado diferente a los concentrados utilizando el ensilaje con *Lactobacillus casei*. En la planta de sacrificio de FrigoColanta no se le ha dado un tratamiento al contenido ruminal para convertirlo en un suplemento alimenticio para bovinos, esto podría representar un beneficio para la empresa ya que se reducen los costos por el consumo de alimento concentrado y se aprovecha un desperdicio generado en el proceso.

1. OBJETIVOS

1.1. GENERAL

Evaluar el contenido ruminal como suplemento alimenticio para el consumo de ganado bovino ensilándolo con *Lactobacillus casei*.

1.2. ESPECÍFICOS

- Desarrollar productos líquidos con base en *Lactobacillus casei* para su posterior aplicación en el proceso de ensilaje del contenido ruminal obtenido de la planta de sacrificio de Colanta.
- Evaluar el proceso de ensilaje con los productos desarrollados por medio de análisis bromatológicos con el fin de determinar cuál de ellos genera las mejores características nutricionales de ensilado.
- Evaluar diferentes dosificaciones del mejor producto desarrollado con relaciones de gramos de formulación / gramos de producto ensilado para identificar cual genera una mejor calidad del ensilaje.
- Evaluar la composición bromatológica del ensilado y el consumo por parte de los bovinos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. RUMEN Y CONTENIDO RUMINAL

El contenido ruminal es un producto obtenido de la matanza del ganado y representa el alimento ingerido por los animales poligástricos que es desechado al momento del sacrificio. Es una mezcla de material no digerido que tiene la consistencia de una papilla, con un color amarillo verdoso y un olor característico muy intenso cuando está fresco. (Trillos *et al.*, 2007).

El rumen es un ecosistema anaeróbico que presenta características muy particulares de pH, temperatura y una inmensa población de microorganismos como protozoos, hongos y bacterias que están en simbiosis con el animal hospedero. En la medida en que el hombre pueda manipular estos microorganismos, se hará de los hospederos animales más eficientes y se logrará una mejor respuesta a técnicas deficientes de alimentación (Botero, 1998).

En este ecosistema los microorganismos endosimbioses transforman los diferentes alimentos ingeridos por el rumiante, en ácidos grasos volátiles y proteína microbiana utilizable para la nutrición y producción del hospedador. El amonio constituye la principal fuente para la síntesis de proteína microbiana entre un 50% y 70% del total. Siendo mayor el crecimiento bacteriano cuando se incorporan péptidos y aminoácidos en la dieta (Baldwin y Allison, 1983).

La región dorsal del rumen posee más materia seca, 14-18%, que la región ventral que tiene entre 6-9%. La temperatura se mantiene entre 38-42°C, el pH ruminal 6.2-6.8 (Febel y Feteke, 1996; Van Soest, 1994) y la cantidad de gases son

aproximadamente: CO₂: 65%, CH₄: 27%, N₂: 7%, O₂: 0.6%, H₂: 0.2%, H₂S: 0.01% (Yokoyama y Ka, 1993).

2.1.1. Estómago de los rumiantes

La capacidad de los rumiantes de transformar las plantas que ingieren (forrajes, pastos, malezas) los diferencia en parte de los monogástricos por el hecho de poseer un sistema digestivo capaz de realizar esta operación, condición que no poseen los animales de un solo estómago. Entre las características del digestivo bovino está el tener un estómago dividido en cuatro compartimientos, dos anteriores y dos posteriores, los primeros son el retículo (bonete) y el rumen (panza), los segundos incluyen el omaso (librillo) y el abomaso (cuajar) (Dyce *et al.*, 1999).

El sector anterior (rumen y retículo) es el que realiza los procesos de acumulación, estratificación y transformación del material alimenticio que los poligástricos ingieren para producir sustancias útiles y de desecho para el rumiante (Dyce *et al.*, 1999).

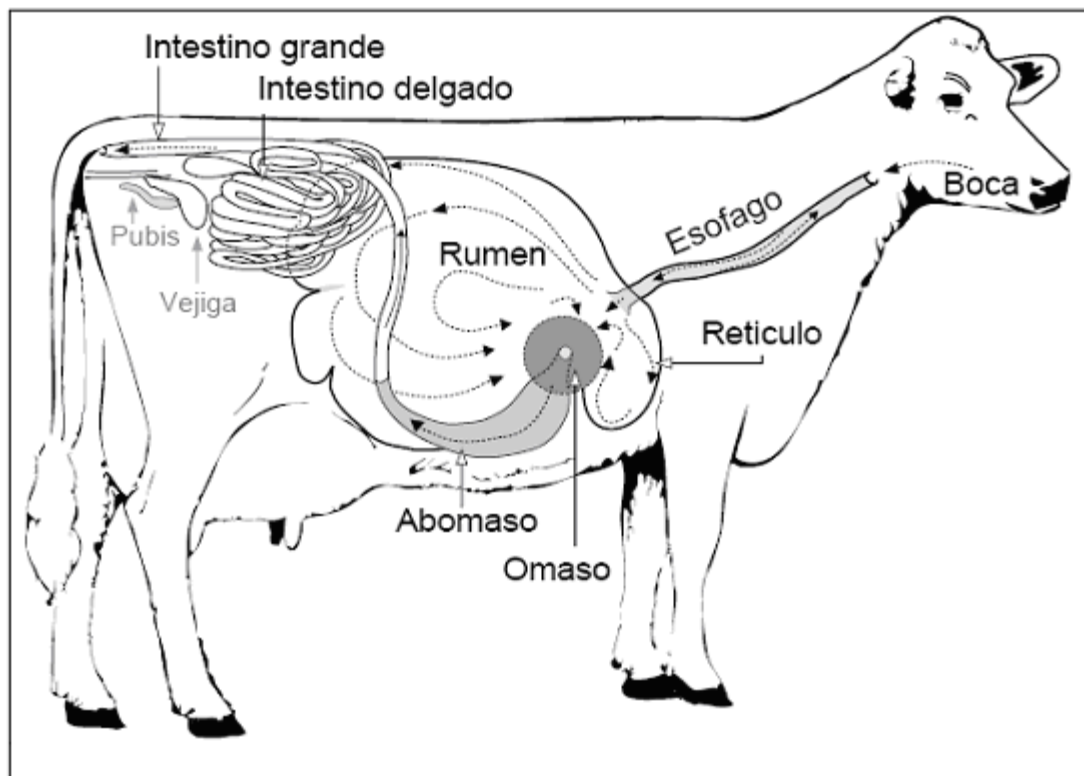
El contenido del retículo se mezcla con el del rumen casi constantemente (una vez por minuto). Los dos estómagos comparten una población densa de microorganismos (bacterias, protozoos y hongos). El rumen es un vaso de fermentación grande que puede contener hasta 100 – 120 Kg de materia en digestión. Las partículas de fibra se quedan en el rumen de 20 a 48 horas porque la fermentación bacteriana es un proceso lento. (Wattiaux y Howard, 2007)

El retículo es una intersección de caminos donde las partículas que entran o salen del rumen se separan. Sólo las partículas de un tamaño pequeño (<1-2 mm.) o que son densas (>1.2 g/ml) pueden seguir al tercer estómago (Wattiaux y Howard, 2007).

El tercer estomago u *omaso* es un órgano pequeño que tiene una alta capacidad de absorción. Permite el reciclaje de agua y minerales tales como sodio y fósforo que pueden volver al rumen por la saliva (Wattiaux y Howard, 2007).

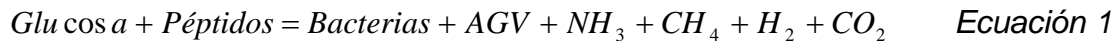
El cuarto estómago es el abomaso. Secreta ácidos fuertes y muchas enzimas digestivas. En los animales no rumiantes, los primeros alimentos se digieren en el abomaso. Sin embargo en los rumiantes, los alimentos que entran el abomaso se componen principalmente de partículas de alimentos no fermentadas, algunos productos finales de la fermentación microbiana y los microbios que crecieron en el rumen. En la Figura 1 se muestra el sistema digestivo de un rumiante con sus cuatro estómagos (Wattiaux y Howard, 2007).

Figura 1. El sistema digestivo de una vaca incluye cuatro estómagos. (Wattiaux y Howard, 2007).

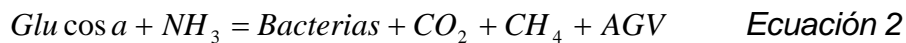


2.1.2. Fermentación ruminal

El proceso metabólico de fermentación ruminal, realizado por la flora y la fauna del sector gástrico anterior del digestivo del bovino se representa de la siguiente forma:



(Cunningham, 1997).



(Van Soest, 1994).

En las dos ecuaciones se puede observar que unos productos se reducen (toman H+) y otros se oxidan (captan O₂). La fermentación es un proceso de oxidoreducción (redox). Estas ecuaciones dan idea de lo producido para beneficio del hospedero: proteína bacteriana, ácidos grasos volátiles (AGV) y ciertos productos no aprovechables, entre los cuales se encuentran los gases metano (CH₄), carbónico (CO₂) y amoníaco (NH₃) (Tamayo, 2007).

Tomando como punto de partida un medio ambiente ruminal en condiciones adecuadas, se detallan los productos formados, partiendo del trabajo bacterial sobre los sustratos aportados con la ración.

Las bacterias proteolíticas atacan los aminoácidos, péptidos, proteína, nitrógeno no proteico (NNP) y urea de la saliva en casos de deficiencia de elementos nitrogenados, para obtener su propia energía, liberando como producto de desecho NH₃; las bacterias Gram positivas lo producen hasta 20 veces más rápido (Forbes y France, 1993).

Las amilolíticas desdoblan los carbohidratos solubles obteniendo energía en forma de ATP para su multiplicación y crecimiento, liberando glucosa como producto

final; por último las bacterias celulíticas aprovechan el NH_3 y la glucosa para la multiplicación de nuevas generaciones bacteriales que pasan al abomaso y al intestino delgado como proteína bacterial; allí es atacada por las enzimas producidas liberando aminoácidos y péptidos que son absorbidos, y por la circulación llegan al hígado donde se forma la proteína aprovechable por el animal hospedero; además desde allí se reparte a los diferentes sistemas orgánicos, incluyendo la glándula mamaria, donde se forma la proteína láctea (Forbes y France, 1993).

2.1.3. Microorganismos del rumen

Los hongos ruminales producen todas las enzimas necesarias para la depolimerización tanto de celulosa como de hemicelulosa y para la hidrólisis de oligosacáridos libres. Estas enzimas son principalmente extracelulares y son producidas durante el estado vegetativo y por las zoosporas del hongo. Ellos muestran su máxima actividad a amplios rangos de temperatura y pH. (Fonty, 1991). La población de hongos en el rumen es alrededor de 10.000 hongos/mL de contenido ruminal y son capaces de digerir las paredes celulares para permitir la acción degradatoria de las bacterias (Nava y Díaz, 2001).

Los protozoos representan aproximadamente el 50% de la biomasa microbial del rumen y son una importante, aunque no esencial, población para el rumiante. Los protozoos ciliados, principalmente organismos del rumen, dependen de las proteínas de la dieta y de su degradación parcial en compuestos de bajo peso molecular para su crecimiento, reduciendo de este modo la cantidad de proteína disponible para el animal huésped (Jouany, 1991).

La población de bacterias ocupa 10^{10} a 10^{11} células/gr. de contenido ruminal, siendo éstos los microorganismos más abundantes. La mayoría son anaerobias estrictas, no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno (Nava y Díaz, 2001).

Las bacterias del rumen desempeñan unas funciones vitales para el animal hospedero tales como:

- Las fibras y otros materiales contenidos en las plantas no se podrían degradar por el animal hospedero si no fuese por las enzimas que producen las bacterias; estos materiales se transforman, son degradados en ácidos grasos volátiles (AGV), dióxido de carbono y metano. Los AGV pasan luego al sistema circulatorio para ser la principal fuente de energía del animal hospedero.
- Sintetizar ciertas vitaminas que pueden ser usadas por el animal hospedero.
- Degradar compuestos tóxicos de las dietas (Botero, 1998).

En el rumen se citan aproximadamente 29 géneros y 63 especies, siendo la mayor parte de estas bacterias anaerobias y no esporulantes, y algunas de ellas no requieren de las condiciones anaerobias para su desarrollo, como es el caso de *Streptococcus bovis* y de *Lactobacillus sp.* (Dukes, 1970).

El contenido ruminal está constituido fundamentalmente por bacterias pequeñas como son bacilos Gram positivos y Gram negativos, formas cocobacilares, cocos, vibrios, bacterias en cadena (estreptococos y estafilococos), y formas semilunares, entre otras. (Stewart y Bryant, 1988; Galindo, 1991).

2.1.4. Grupos metabólicos y algunos aislamientos ruminales

Bacterias celulíticas: estas bacterias dan origen a enzimas celulíticas que hidrolizan la celulosa. Se hallan en altas concentraciones en animales que consumen raciones fibrosas. Entre estas se tienen: *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium locheadii*, *Eubacterium celulosolvens*, *Eubacterium spp.*, *Cellulomonas fimi* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).

- **Bacterias que digieren la hemicelulosa:** estas bacterias actúan sobre sustancias que son pentosas, hexosas y en ocasiones sobre algunos ácidos, estando presente como constituyente de las plantas. La hemicelulosa es un constituyente de las plantas y los microorganismos que la hidrolizan suelen ser capaces de utilizar también este polímero. Entre estos se encuentran *Bacteroides fibrisolvans*, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Bacteroides ruminicola* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Bacterias amilolíticas:** suelen predominar en el rumen cuando se consumen dietas ricas en almidón, entre estas bacterias se encuentran *Bacteroides amylophilus*, *Succinomonas amylofilica*, *Butyvirbio alactacidigenes*, *Streptococcus bovis*. Existen algunas bacterias como *B. Ruminicola*, que parecen ser más prevalentes con dietas pobres en almidón (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Bacterias que utilizan azúcares:** en el rumen de animales jóvenes se encuentran grandes concentraciones de microorganismos capaces de utilizar la lactosa, entre ellos: *Veillonella alcalescens*, *Peptostreptococcus elsdenii*, *Selenomonas lactylitica*, *Succinivibrio dextrinosolvans*, *Eubacterium ruminantium* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Bacterias proteolíticas:** Muchas bacterias ruminales emplean los aminoácidos como fuente primaria de energía, entre estos están algunos microorganismos como *Bacteroides ruminicola*, *Treponema saccharophilum*, *Megasphaera elsdenii* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Bacterias que producen metano:** Son difíciles de cultivar “in vitro”, su presencia en el rumen es grande, dado que del total de los gases del rumen, el metano está entre el 25-30% de los mismos. Entre estas bacterias se encuentran: *Methanobacterium ruminantium*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanobacterium formicium*, *Methanosarcina bakeri* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).

- **Bacterias lipolíticas:** suspensiones mixtas de bacterias que son capaces de utilizar el glicerol y obtenerlo por hidrólisis a partir de moléculas de grasa. Algunos de estos microorganismos hidrogenan ácidos grasos insaturados, entre estos microorganismos se encuentran *Anaerovibrio lipolytica*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium longisporum*, *Micromonospora ruminantium* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Bacterias productoras de amoníaco:** La producción de amoníaco mediante la desaminación de aminoácidos es realizada por *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* y unas pocas especies de *Butyrivibrio*. En general, el amoníaco es más importante como fuente de nitrógeno para aquellas bacterias del rumen que digieren carbohidratos complejos en lugar de azúcares sencillos (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Bacterias que utilizan el etanol:** *Clostridium kluyvertii* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Bacterias que utilizan sulfatos:** *Clostridium nigrificans*, *Desulphatamaculum ruminis*, *Desulphovibrio spp.* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Lactobacilli:** *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Bacterias degradadoras de oxalato:** *Oxalobacter formigenes*, *Pseudomonas oxalaticus* (Dukes y Swenson, 1970; Church, 1974; Stewart y Bryant, 1988; Alzate, 1994).
- **Bacterias que utilizan ácidos:** un gran número de bacterias utilizan ácido láctico, no obstante este ácido no está presente en cantidades apreciables en el rumen, excepto en condiciones anormales. Otras bacterias utilizan ácido

succínico, málico y fumárico, también utilizan ácido fórmico y ácido acético, pero probablemente no como fuentes primarias de energía. También el ácido oxálico es descompuesto por bacterias ruminales. Ejemplo de bacterias que utilizan lactato: *Veillonella gazogenes*, *Veillonella alcalescens*, *Propionibacterium sp.*, *Desulphovibrio* y *Selenomona lactilytica* (Grudsky y Arias, 1983).

2.1.5. Impacto en el medio ambiente

Los elementos contaminantes que produce el ganado vacuno son el nitrógeno, minerales (fósforo, potasio y azufre), dióxido de carbono y metano. El dióxido de carbono y metano contribuyen a la disminución de la capa de ozono y a crear el “efecto invernadero”. El nitrógeno, fósforo y potasio que se excretan en las heces tienen valor cuando vuelven como fertilizantes al campo para producir más alimentos. Sin embargo, cuando la fertilización se hace con exceso y por encima de las necesidades de la tierra, puede haber contaminación de las capas freáticas (González, 1996).

2.2. ENSILAJE

2.2.1. Definición

El objetivo del ensilaje es preservar los nutrientes originales de los forrajes, especialmente los componentes energéticos y proteínicos, mediante la aplicación de un método de conservación. Se basa en la fermentación en estado sólido a ácido láctico bajo condiciones anaerobias por las que las bacterias ácido lácticas convierten los azúcares solubles en agua y en ácidos orgánicos. En este proceso de fermentación el material ensilado experimenta una serie de cambios

bioquímicos que lo mantienen estable por largos períodos (Woolford, 1998; Bernal y Chaverra, 2000).

Una rápida caída en el pH durante el ensilaje y un aumento en las concentraciones de ácidos orgánicos inhiben el crecimiento de microorganismos que causan el deterioro de este. (Pahlow *et al.*, 2003).

La elaboración de ensilaje biológico es preservada por el ácido láctico formado en los procesos de fermentación. La producción de ácido láctico requiere grandes cantidades de carbohidratos fermentables en el material ensilado. Si el contenido es insuficiente, se deben adicionar carbohidratos de una forma apropiada. En la práctica se utilizan diferentes carbohidratos para este propósito. Su valor para la fermentación de ácido láctico es altamente variable. Se recomienda la adición de azúcar, en forma de melaza para mejorar la calidad del ensilaje (Conrad *et al.*, 1956).

Al asegurar la presencia de suficientes bacterias ácido lácticas para causar una rápida reducción del pH, se eliminan fermentaciones no deseables y se reduce la proteólisis (Pahlow *et al.*, 2003).

El ensilaje es una técnica que permite conservar el forraje en un estado físico parecido al que tenía en el momento de la recolección. Su composición química está modificada por las fermentaciones que sufre. Un buen ensilaje depende de la interacción de tres factores: (Loaiza, 2000).

- Composición del material que se ensila.
- Cantidad de aire atrapado dentro de la masa del silo o que se deje penetrar a ella.
- Las bacterias existentes en el material vegetal.

2.2.2. Descripción del proceso de ensilaje

El proceso de ensilaje puede ser dividido en tres fases principales: presellado, fermentación y vaciado. La fase de presellado representa el tiempo de inicio del llenado al sellado de la estructura del silo. Durante esta fase, el aire todavía está presente y la respiración de las plantas continúa. Una gran porción de energía generada por la respiración de la planta es liberada en forma de calor. En el silo este calor no se disipa realmente. Así que la temperatura en el silo se eleva. Una vez que el silo ha sido sellado la respiración de las plantas cesa al cabo de un par de horas. Los forrajes se cortan antes del ensilaje para minimizar el espacio de aire entre las partículas del forraje e incrementar la oportunidad de que las bacterias ácido lácticas entren en contacto directo con los azúcares de las plantas. El índice de llenado debe ser lo más rápido posible con el fin de limitar las pérdidas por respiración antes de que se inicie la fermentación. Después que el oxígeno se excluya se llevan a cabo los procesos de fermentación. Un inóculo de bacterias productoras de ácido láctico puede tener efectos benéficos en la velocidad y el tipo de fermentación en los cultivos ensilados. Una caída rápida en el pH a través de la fermentación homoláctica ayudará a restringir la actividad de las enzimas de las plantas. Las bacterias ácido lácticas crecen alrededor de 1 a 4 semanas bajando el pH de 5 a 3.8 dependiendo de la humedad, la capacidad amortiguadora y el contenido de azúcar. Cuando el silo se abre ocurre la fase final del vaciado. El ensilado bien fermentado necesita ser protegido del oxígeno para prevenir mayores pérdidas de materia seca y los cambios en la calidad del forraje. Si la fase de fermentación estuvo bien hecha, deberá haber de 10 a 20 L de ácido láctico por tonelada de ensilaje (Nicklas-Bray *et al.*, 1998).

2.2.3. Bioquímica del ensilaje

Las bacterias productoras de ácido láctico (BAC) son gram-positivas, microaerofílicas, esporógenas, usualmente sin motilidad, y fermentan los azúcares. Existen divisiones basadas en la morfología de las células y tipo de fermentación; pueden ser homofermentativas, si transforman los azúcares completamente en ácido láctico, y heterofermentativas, cuando se forman otros productos, además de ácido láctico, principalmente dióxido de carbono.

La presencia de los diferentes géneros de bacterias productoras de ácido láctico y su población total dependen de la “maduración” del ensilaje. *Lactobacillus* tiende a ser el género dominante cuando el ensilaje madura (Bernal y Chaverra, 2000).

Las bacterias de tipo anaerobio, entre las cuales se tienen: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. brevis*, *L. plantarum* y *L. casei* (Guzmán, 1998), actúan sobre los carbohidratos disponibles en el forraje para producir ácido láctico y pequeñas cantidades de ácido acético, propiónico, fórmico y succínico (ICA, 1985).

Cuando la humedad del material y el pH son muy altos se desarrollan bacterias indeseables del género *Clostridium*, las cuales producen ácido butírico, amoníaco y aminas, característica de materia orgánica en descomposición e indicativo de un ensilaje de mala calidad. El desarrollo de estas bacterias se evita bajando la humedad a menos del 70% o aumentando la acidez (Bernal, 1998).

Las bacterias productoras de ácido láctico prefieren un clima templado, ligeramente encapotado, con humedad relativa alta, calmado y con baja evaporación. Los clostridios son poco afectados por los factores climáticos. Las levaduras se favorecen bajo condiciones de tiempo húmedo, claro a encapotado y con lluvias, humedad relativa baja y poco o ningún movimiento de aire. Los hongos filamentosos se desarrollan mejor en condiciones de temperatura media a baja y sin grandes fluctuaciones, nublado y con alta evaporación (Bernal y Chaverra, 2000).

El contenido de ácido butírico en un ensilado es un indicador importante en la degradación de la proteína del forraje. La temperatura óptima para el desarrollo de las bacterias que producen ácidos, se encuentra entre 26° y 39°C y su crecimiento cesa a los 50°C (Mcilroy, 1987).

En el proceso de fermentación del material ensilado, los azúcares son atacados por las enzimas y se produce alcohol etílico y otros. Los alcoholes en combinación con los ácidos orgánicos dan un aroma agradable al ensilaje, el contenido de alcohol puede ser superior al 1% (Masuko *et al.*, 1992).

La concentración de ácido láctico en el ensilaje puede llegar a constituir de 8 a 9% de la materia seca en condiciones favorables. Cuando el material no tienen suficientes carbohidratos solubles para producir el ácido láctico necesario, como ocurre con las leguminosas, es necesario adicionar materiales ricos en estos elementos como la melaza, grano molido, entre otros, al momento de ensilar (Masuko *et al.*, 1992).

El ácido producido reduce el pH del silo a 4.2 o menos. La compactación inadecuada, característica del material con una gran proporción de tallos, produce un exceso de respiración y sobrecalentamiento, con grandes pérdidas de materia seca, reducción de la digestibilidad de las proteínas y pérdidas de carotenos. El exceso de compactación, como sucede con las herbáceas suculentas, produce subcalentamiento, dando como resultado un producto de mal olor y carente de apetitosidad (Mcilroy, 1987); a bajos valores de pH se inhibe el desarrollo bacteriano y las reacciones enzimáticas y se puede preservar el ensilaje. El proceso se completa en un período de 2 o 3 semanas, y se puede conservar por años si no se permite la entrada de aire (Masuko *et al.*, 1992; Mcilroy, 1987; McDonald *et al.*, 1991).

El éxito del ensilaje consiste en una buena distribución del material y un adecuado apisonamiento y tapado para desalojar la mayor cantidad de aire posible al comienzo del proceso. (Bernal, 1998).

2.2.4. Calidad del ensilaje

La calidad del ensilaje y su valor nutricional se ven afectados por varios factores biológicos y tecnológicos, los cuales incluyen: etapa de madurez, humedad, longitud de corte, índice de llenado del silo, densidad del empaçado, método de sellado, uso de un inóculo de ensilado, índice de vaciado, condiciones climáticas a la cosecha y el vaciado (Nicklas-Bray *et al.*, 1998).

Una alta población inicial de *Lactobacillus* debe conducir a la obtención de un ensilaje de buena calidad. En los estados avanzados se espera que la microflora sea dominada por *Lactobacillus* en los ensilajes de buena calidad, y por *Clostridium* en los de baja calidad. La calidad del ensilaje se evalúa de acuerdo a su valor nutritivo, apariencia, características físico- químicas y producción de los animales que lo consumen (Masuko *et al.*, 1992; Guzmán, 1998). Generalmente, se asocia ésta con alguna característica como el olor, color, textura, gustosidad y naturaleza de la cosecha ensilada (Zapata, 1992).

La calidad también se puede determinar según pérdidas de materia seca, pH, productos finales de la fermentación (ácido láctico y ácidos grasos volátiles), interrupción de la proteína y examinación microbiológica (Tabla 1). Las pruebas para determinar la estabilidad aerobia de ensilajes incluyen medidas del aumento de la temperatura durante la exposición al aire o de la producción de CO₂ (Ashbell *et al.*, 1991).

Tabla 1. Características asociadas con el ensilaje de alta y baja calidad (Loaiza, 2000).

DETALLE	BUENA CALIDAD	MALA CALIDAD
pH	4.0	5.5
Ácido láctico (% en M.S.)	8.5	1.1
Ácido acético (% en M.S.)	1.5	3.0
Ácido butírico (% en M.S.)	0.5	3.5
Nitrógeno amoniacal	1.0	4.0
Color	Verde amarillento	Negro
Olor	Agradable	Pútrido
Apariencia	Sin hongos	Con hongos
Humedad	68%	>71 y < 68%
Sabor (consumo)	Avidez	Rechazo

2.2.5. Evaluación de ensilajes

Los ensilajes pueden evaluarse cualitativamente mediante indicadores como el olor, color y textura (Tabla 2), o cuantitativamente por valores de pH, la presencia de ácidos fermentables, los componentes nutritivos, el nivel probable de consumo y la digestibilidad de la materia seca. (Bernal y Chaverra, 2000).

Tabla 2. Caracterización organoléptica: color, olor, consistencia. (Bernal y Chaverra, 2000).

INDICADOR		PATRÓN DE FERMENTACIÓN	CALIDAD
Color	Verde aceituna o amarillo oscuro	Fermentación láctica Temperatura entre 25 y 30°C	Excelente
Olor	A miel o azucarado de fruta madura		
Textura	El forraje conserva sus contornos continuos, bien definidos. Las hojas permanecen unidas a los tallos.		
Color	Verde amarillento	Fermentación láctica	Buena
Olor	Agradable, con ligero olor a vinagre		
Textura	El forraje conserva sus contornos continuos, bien definidos. Las hojas permanecen unidas a los tallos.		
Color	Verde oscuro	Acética	Regular
Olor	Fuerte, ácido, semejante al vinagre		
Textura	Las hojas se separan fácilmente de los tallos. Las hojas tienden a ser transparentes y los vasos venosos muy amarillos		
Color	Marrón oscuro, casi negro ó negro.	Butírica Temperaturas altas	Mala
Olor	Desagradable, a mantequilla rancia		
Textura	No se aprecia diferencia entre hojas y tallos, masa amorfa, jabonosa al tacto, húmeda y brillante.		

- *Valores de pH:* Su determinación se hace utilizando papel Litmus o un pHmetro digital. Con pH por encima de 4.4 se espera la ocurrencia de fermentaciones secundarias, y entre 3.8 y 4.2, fermentaciones ácido láctico dominantes (Bernal y Chaverra, 2000).
- *Ácidos fermentables:* La concentración de los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, isobutírico, isovalérico y valérico) en el ensilaje se puede determinar por columnas de cromatografía gas – líquido (McAllister *et al.*, 1998).

- *Composición nutritiva*: El valor nutritivo de los alimentos se ha evaluado en función de su contenido de materia seca (MS), proteína bruta (PB): nitrógeno total por 6.25, ceniza, fibra bruta y otros carbohidratos diferentes a la fibra. La fibra detergente ácido (FDA) y la fibra detergente neutro (FDN) como indicadores de calidad, dada su correlación con la digestibilidad del producto, su valor energético y el consumo voluntario del ganado (Bernal y Chaverra, 2000).
- *Materia seca*: antes de ensilar la MS parece tener poco efecto sobre el valor de forraje para el animal, pero influye directamente en la estabilidad del material ensilado durante el período de almacenamiento. Se recomienda cosechar las gramíneas con porcentajes de MS que oscilen entre 20 y 55%, los granos o cereales menores entre 40 y 50% y el maíz y el sorgo entre 25 y 35%. El contenido óptimo estaría entre 30 y 35% (Bernal y Chaverra, 2000).

La eficacia de la fermentación del ensilado se juzga de acuerdo con las proporciones relativas de los ácidos de la fermentación y amoníaco, derivados de la degradación de proteínas. Ensilajes de alta calidad se han asociado con una alta proporción de lo siguiente: (Woolford, 1998).

$$\text{Proporción.ácidos} = \frac{\text{Ácido.láctico}}{\text{Ácido.acético} + \text{ácido.butírico} + \text{amoníaco}} \quad \text{Ecuación 3}$$

A diferencia de fermentaciones industriales tales como la fabricación de cerveza, vino, yogurt, vinagre, antibióticos, entre otros, en donde el medio está exento de microorganismos autóctonos, la fermentación del ensilado depende del dominio ganado por las bacterias ácido lácticas sobre otros componentes de la microflora

del material ensilado. Si se realizaran estos métodos se destruiría muchos de los nutrientes del ensilado (Woolford, 1998).

2.2.6. Tipos de silos

Cuando hay abundancia de pastos, generalmente hay pérdidas del mismo. Una manera apropiada de evitar pérdidas de pasto y guardarlo para los largos períodos de sequía, es colocarlos en silos apropiados (Duthl, 1989).

Hay varios tipos de silos, que se seleccionan según operador, preferencia y circunstancias de alimentación. La capacidad del silo debe ser determinada según la alimentación (clasificación de la manada y las raciones), y las dimensiones se deben calcular para dar una profundidad adecuada del silo para reducir al mínimo la exposición del ensilaje al aire (Duthl, 1989).

Los tipos de silos más comunes:

- *Aéreos o de torre*: poco comunes por los elevados costos de construcción y de llenado; sin embargo, registran las menores pérdidas durante el proceso (Sánchez *et al.*, 2001). Con este tipo de silos hay una mínima exposición del ensilaje al aire. (Pitt, 1993)
- *Subterráneos o de trinchera*: presentan también altos costos de construcción y registran altas pérdidas por filtración de humedad (Sánchez *et al.*, 2001). Almacenan grandes volúmenes de ensilaje. Su *eficacia* depende de las dimensiones del silo, contenido de MS y tipo de forraje (Harrison, 1991).
- *Horizontales (Búnker)*: son los más utilizados por la facilidad de construcción. Existen los silos búnker tradicionales con paredes y piso de

concreto, que minimizan las pérdidas durante la fermentación, pero incrementan los costos (Sánchez *et al.*, 2001).

- *Horizontal de montón*: es el más barato por costos de construcción ya que no tiene paredes, sin embargo se requiere de plástico para proteger la masa forrajera. En estos silos se presenta las mayores pérdidas de forraje (Sánchez *et al.*, 2001).
- *De vacío*: cuando el material a ensilar no sea mayor a dos toneladas se recomienda el silo de bolsa; en este caso, se sugiere la utilización de bolsas con capacidad de 30 a 35 Kg. para facilitar la posterior manipulación. (Sánchez *et al.*, 2001).

Ventajas del silo

- Preservar al máximo los nutrientes cuando un cultivo se cosecha para ensilar.
- Se reducen las pérdidas por mal tiempo o estado de desarrollo del cultivo.
- Presenta menos necesidades de suplementación.
- Permite mayor utilización de la maquinaria.
- Se reducen las pérdidas en la cosecha y manipuleo cuando se usan los equipos apropiados.
- Se reducen los costos de alimentación.
- Se puede conservar por mucho tiempo con pequeñas pérdidas.
- Aumentar la capacidad de sostenimiento por hectárea. (Bernal, 1998).

Desventajas del silo

- El ensilaje prácticamente no tiene mercadeo, se debe consumir en la misma finca en que se produce. Esta situación tiende a cambiar al mejorar los métodos de transporte.
- Es voluminoso para almacenar y manejar.
- La mecanización es costosa.
- Se debe suministrar rápidamente después de retirarlo del silo para evitar pudriciones.
- Las pérdidas pueden ser muy grandes cuando no se hace adecuadamente. (Bernal, 1998).

2.3. INOCULANTES

La adición de inoculantes microbiales homofermentadores ayuda a disminuir más rápido el pH, inhibiendo otras bacterias y conservando la proteína de la planta. Una rápida disminución en el pH y un bajo pH al final puede inhibir las bacterias de *Clostridium* que producen ácido butírico. Normalmente menos ácido acético, butírico, y etanol es producido durante la homofermentación, la cual mejora la recuperación de la materia seca entre un 2 a 3 % comparado con la heterofermentación. Además, los inoculantes homofermentativos pueden mejorar el desempeño animal en un 3 a 5%. (Contreras y Muck, 2006).

Lo más importante de los inoculantes es la cantidad de bacterias productoras de ácido láctico vivas por unidad de cultivo (dosis de inoculación). Un producto debe asegurar al menos 9×10^{10} bacterias productoras de ácido láctico vivas por tonelada de cultivo o bien 100,000 por gramo de cultivo (Contreras y Muck, 2006).

❖ *Bacterias ácido lácticas*: Deben cumplir con ciertos criterios a la hora de seleccionarlas como inoculantes de ensilado (Woolford, 1998):

- Tener una tasa rápida de crecimiento y ser capaz de competir y dominar organismos presentes en el ensilado.
- Ser homofermentativas.
- Ser resistentes a los ácidos y producir rápidamente un pH final de 4.0.
- Ser capaces de fermentar glucosa, fructosa, sacarosa y de preferencia, fructosanos y pentosanos.
- No deben tener ninguna acción sobre ácidos orgánicos.
- Deben tener un buen crecimiento en un amplio rango de temperatura, de preferencia arriba de 50°C para sobrevivir a cualquier aumento de temperatura durante las primeras etapas del ensilaje.
- Deben carecer de actividad proteolítica.

2.4. TECNOLOGÍA DE LA FORMULACIÓN

Las funciones básicas de la formulación:

- Estabilizar el organismo durante la producción, distribución y almacenamiento.
- Ayudar a la manipulación y aplicación del producto, así es fácilmente entregado a su destino de la forma más apropiada.

- Proteger el agente de factores ambientales perjudiciales, de esta manera se aumenta la persistencia.

Existe un amplio rango de formulaciones sólidas y líquidas, los tipos principales usados para microorganismos han sido clasificados por Rhodes (1993) en productos secos (polvos, gránulos y bloques) y suspensiones (base aceite o base agua y emulsiones) (Jones, 1998).

En las formulaciones líquidas el microorganismo se lleva en un líquido, normalmente agua o aceite. El aceite se evapora mucho menos que el agua debido a la presión de vapor y a la viscosidad. Por esta razón los vehículos de aceite son más usados para spray de volumen ultra bajo (ULV). Si se usa agua, se adiciona un antievaporante o un humectante. Los antievaporantes pueden formar una película a la superficie de las gotas para reducir la evaporación: casi siempre son polímeros solubles en agua. Los humectantes como el glicerol, glicol aumentan la higroscopicidad para reducir la evaporación. (Burgess, 1998).

Existen suspensiones de partículas en líquidos, con 10-40% del microorganismo, 1-3% de ingredientes suspendidos, 1-5% dispersantes, 3-8% surfactantes y un 35-65% del vehículo líquido (aceite o agua). Los productos se previenen de la aglomeración con dispersantes, los surfactantes actúan como agentes mojables. Generalmente se utilizan aceites biodegradables como los aceites vegetales. (Burgess, 1998).

2.4.1. Emulsiones aceite en agua

La mayoría de los trabajos que se han realizado con emulsiones han sido con sistemas en los cuales varios aceites son dispersos en agua, este tipo de emulsión es conocida como aceite en agua.

Con el fin de preparar emulsiones estables para cualquiera de los dos tipos, agua en aceite (W/O) ó aceite en agua (O/W), además de los dos líquidos, es necesario que exista una tercera sustancia conocida como emulsificante ó agente dispersante.

Las sustancias coloidales solubles en agua fomentan las emulsiones del tipo O/W, mientras que los coloides solubles en aceite fomentan las del tipo W/O.

Para las emulsiones aceite en agua, los coloides hidrofílicos usuales que han sido reconocidos como agentes emulsificantes son proteínas, gomas, almidón, pectinas, ácido tánico, entre otras (Clayton, 1943).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. MATERIALES

En la fermentación del *L. casei* se utilizaron los siguientes reactivos para el medio MRS:

- Glucosa anhidra, grado técnico, (MERCK).
- Extracto de levadura, (OXOID).
- Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), (J.T.Baker).
- Fosfato monoácido de potasio (K_2HPO_4), (MERCK).
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), (Carlo Erba Reagenti).
- Sulfato de manganeso hidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), (MERCK).
- Sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), (Carlo Erba Reagenti).
- Ácido ascórbico, (Baker Analyzed).
- Agar – Agar, (MERCK).
- Carbonato de calcio, (Panreac Química S.A).
- Erlenmeyers de 100 y 500 mL, (SCHOTT).

Para el desarrollo de las formulaciones líquidas se utilizó:

- CMC (GELYCEL F2-10-S), grado alimenticio y farmacéutico (Química Amtex).
- Aceite de girasol, (Premier).
- Goma xantana, (Bell Chem).
- Tween 20PS, (Panreac Química S.A).

Para realizar los dos ensilajes se utilizaron los siguientes materiales:

- Contenido ruminal proveniente de FrigoColanta.
- Melaza de caña
- Cabuya
- Bolsas de polietileno

3.2. EQUIPOS

Para la obtención de biomasa del microorganismo y el desarrollo de las formulaciones líquidas se utilizaron equipos que pertenecen al laboratorio de biotecnología de la Universidad Eafit:

- Cámara de flujo laminar vertical, modelo 100V, (C4 ®).
- Autoclave horizontal EASTERN modelo EA – 620.
- pHmetro, modelo 744, (Metrohm).
- Incubadora digital, (WTB Binder).

- Agitador lineal con control de temperatura, modelo Promax 2020, (Heidolph)
- Nevera (Haceb).
- Centrífuga, modelo universal 32R, (Hettich).
- Espectrofotómetro, modelo Helios Gamma, (Innovatek).
- Balanza analítica, modelo BP 3015 (Santorius).
- Viscosímetro Brookfield, modelo DV-E.
- Viscosímetro de Ostwald, (ECOVILAB).

Para el trabajo de campo se utilizó un pHmetro marca WTW, modelo PH330, serial 82594083, este equipo fue suministrado por el laboratorio de aguas residuales de la planta de sacrificio de FrigoColanta.

3.3. UBICACIÓN

La primera parte del proyecto se desarrolló en Medellín, en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Eafit donde se realizó la reproducción del microorganismo con el cual se obtuvieron las diferentes formulaciones. La segunda parte del proyecto se llevó a cabo en la planta de sacrificio de FrigoColanta ubicada en Santa Rosa de Osos donde se realizó el ensilaje del contenido ruminal y finalmente en una finca lechera ubicada en el municipio de Don Matías (Antioquia) se realizaron las pruebas de consumo en novillas de levante.

3.4. PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Lactobacillus casei*

3.4.1. Microorganismo

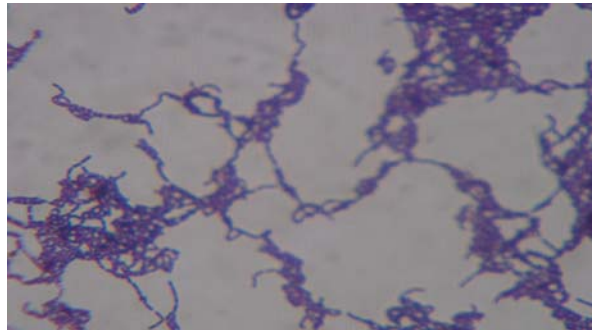
Para las formulaciones líquidas se utilizó *Lactobacillus casei* ATCC 7469 (Figura 2) proveniente de “The Global Bioresource centerTM”. Este microorganismo fue conservado en crioviales a -4°C.

Inicialmente la bacteria se encontraba liofilizada y fue activada de la siguiente forma según Suárez (2007):

- Se agregó una asada del liófilo a 20 mL de medio líquido MRS y se ubicó en un shaker a 37°C y 90 rpm durante dos días.
- El caldo de cultivo resultante fue el inóculo para sembrar en una caja Petri con agar MRS, la cual a su vez sirvió para almacenar la cepa en el sistema de perlas Criobank para lo cual:
 - De una caja Petri de cultivo fresco se retiró toda la biomasa con un asa estéril y se disolvió en el medio que contenía el sistema de perlas.
 - Se agitó hasta incorporar completamente la muestra al medio invirtiendo el vial. Esto permitió que las bacterias se adhirieran a las perlas.
 - Con una pipeta estéril, se removió el medio de cultivo de Criobank y las perlas se almacenaron a -4°C.

Se tomó una perla crioconservada y con un asa se extendió sobre medio MRS sólido en una caja Petri. La caja se almacenó en una incubadora durante 32 horas a 37°C. Este procedimiento se realizó por duplicado. Una vez finalizado este tiempo, se conservaron las cajas Petri a 4°C y se utilizaron como fuente de trabajo (Suárez, 2007).

Figura 2. *Lactobacillus casei* ATCC 7469



3.4.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo sólido utilizado fue el agar MRS (Tabla 3), el cual fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe (1960) para el crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. Una vez preparado el medio de cultivo este fue esterilizado en una autoclave horizontal EASTERN modelo EA – 620 a 121°C, a 15 psig durante 20 minutos.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo MRS (Guoqiang *et al.*, 1991).

Compuesto	Composición (g/L)
Glucosa	30
Extracto de levadura	10
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
Citrato de sodio	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,0005
MnSO ₄ · H ₂ O	0,0031
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,02
Acido ascórbico	0,005
Agar – Agar	13

El medio de cultivo líquido para la producción de biomasa de *L. casei*, contenía la misma composición que el agar MRS, a excepción del agar-agar, y se le adicionó 15 g/L de CaCO₃ con el fin de estabilizar el pH (Suárez, 2007). El pH del medio de cultivo se ajustó a un valor de 5.5.

3.4.3. Fermentación de *Lactobacillus casei*

El preinóculo se realizó adicionando tres asadas de la bacteria obtenida en caja Petri en 20 mL de medio MRS en un erlenmeyer de 100 mL y se incubó a 37°C, 150 rpm por 32 horas obteniéndose una densidad óptica de 2.07. Posteriormente, el preinóculo fue transferido a 180 mL de medio MRS en erlenmeyers de 500 mL y se cultivó bajo las mismas condiciones por 32 horas.

3.4.4. Métodos de medición

3.4.4.1. Medición de biomasa por densidad óptica: El tiempo de fermentación de *L. casei* fue de 32 horas, tiempo durante el cual se tomaron muestras de 1.5 mL cada dos horas. Cada muestra fue centrifugada a una velocidad de 14000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C, luego se retiró el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en HCl 1M con el fin de disolver el carbonato de calcio. Posteriormente se centrifugó la muestra bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en agua desionizada. La densidad óptica fue determinada a 620 nm en el espectrofotómetro marca Cole Parmer, Helios Gamma (Suárez, 2007).

Se realizó una curva de calibración con el fin de determinar la relación entre la concentración de biomasa en g/L y la densidad óptica.

A partir de la muestra final a las 32 horas, se realizaron varias diluciones para obtener concentraciones estimadas según la ecuación 4.

$$V_1C_1 = V_2C_2 \qquad \text{Ecuación 4}$$

Donde

V: Volumen

C: Concentración

Los subíndices 1 y 2 corresponden a la muestra a preparar y a la muestra final a las 32 h respectivamente.

3.4.4.2. Consumo de sustrato: El consumo de sustrato fue determinado para la fermentación de *L. casei* en el medio MRS. Dicha cuantificación de azúcares reductores se llevó a cabo por el método del ácido dinitrosalicílico DNS (Miller, 1959). Su eficacia consiste en que los azúcares reductores reaccionan con el 3-5 ácido dinitrosalicílico en una solución alcalina. La prueba positiva da un color rojo-marrón. La coloración se mide con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm para mediciones cuantitativas. Esta prueba funciona para la glucosa, y otros azúcares reductores. El procedimiento se llevó a cabo después de obtener el sobrenadante por centrifugación y resuspenderlo en HCl 1M (anexo B) para cada una de las muestras tomadas durante el proceso fermentativo (Suárez, 2007).

3.4.4.3. Tinción de Gram: para asegurar que no hubiera contaminación y que estuviera presente el *L. casei* se realizó durante todo el proyecto la prueba de

tinción de Gram (anexo A) a la cepa inicial, a la fermentación y a las formulaciones líquidas.

3.5. DESARROLLO DE FORMULACIONES LÍQUIDAS

En el proyecto se realizaron tres formulaciones líquidas diferentes: en agua, en aceite vegetal y en una emulsión aceite en agua. Para el desarrollo de las formulaciones se utilizaron aditivos como surfactantes, dispersantes y gelificantes para mejorar su desempeño.

3.5.1. Pruebas preliminares

Para la formulación en agua se adicionó carboximetilcelulosa (CMC) antes de resuspender la biomasa y para la formulación en emulsión se adicionó goma xantana en diferentes concentraciones y tween 20 como agentes emulsificantes (Clayton, 1943).

Se midieron diferentes propiedades físicas y químicas de cada formulación como viscosidad, pH, densidad, color, olor y UFC/mL. La viscosidad para el aceite y la emulsión se midió con un viscosímetro Brookfield con aguja #1 y #4 respectivamente y para el agua se midió con un viscosímetro de Ostwald, la densidad se midió calculando los pesos y volúmenes de las formulaciones y el pH se leyó con un pHmetro Metrohm 744.

La viscosidad para la formulación en agua con CMC se midió con un viscosímetro de Ostwald, para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$\eta_1 = \frac{\eta_2 * \rho_1 * t_1}{\rho_2 * t_2} \quad \text{Ecuación 5 (Aulton, 2004)}$$

Donde:

η_1 = Viscosidad de la muestra (agua con CMC).

η_2 = Viscosidad del agua (1 cP).

ρ_1 = Densidad de la muestra.

ρ_2 = Densidad del agua (1 g/cm³).

t_1 y t_2 = Tiempo necesario para que el líquido desaloje un volumen determinado.

3.5.2. Proceso productivo de las formulaciones

Todas las formulaciones líquidas utilizaron la biomasa obtenida del proceso descrito en el numeral 3.4.3. Para ello, el caldo de fermentación se distribuyó en tubos falcon de 15 mL previamente esterilizados, se adicionaron 12 mL en cada tubo y se centrifugaron a una velocidad de 4500 rpm durante 20 minutos. Posteriormente el sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 12 mL de su vehículo correspondiente, finalmente esta mezcla fue adicionada en un frasco esterilizado. Para cada frasco se utilizaron 42 tubos falcon hasta completar un volumen de 500 mL. El proceso de producción del vehículo correspondiente para cada formulación se describe a continuación:

3.5.2.1. Formulación líquida en agua: el vehículo utilizado en esta formulación fue una mezcla de agua desionizada con CMC. La Carboximetilcelulosa de sodio se adicionó como agente dispersante en una concentración del 0.3% con el fin de mantener las partículas de biomasa en suspensión, y se llevó a agitación en

plancha a una velocidad de 1500 rpm durante 30 minutos. Todos los materiales fueron esterilizados previamente por separado a una temperatura de 121°C y 15 psig durante 20 minutos.

3.5.2.2. Formulación líquida en aceite vegetal: en esta formulación se utilizó como vehículo aceite de girasol Premier. Se agitó en plancha a una velocidad de 1500 rpm durante 40 minutos. Todos los materiales fueron esterilizados previamente a una temperatura de 121°C y una presión de 15 psi durante 20 minutos.

3.5.2.3. Formulación líquida en emulsión aceite en agua: se utilizó como vehículo una emulsión aceite en agua previamente preparada. Para la preparación de la emulsión se utilizó un 70% de agua desionizada y un 30% de aceite de girasol. Para lograr la homogenización de los dos compuestos se adicionó goma xantana a una concentración del 0.3%, este es un agente espesante y estabiliza emulsiones de este tipo, también se adicionó Tween 20 a una concentración del 1.2% el cual actúa como un agente surfactante. Una vez mezclados todos los reactivos se licuó la emulsión durante 10 minutos. Todos los materiales fueron esterilizados previamente a una temperatura de 121°C y una presión de 15 psi durante 20 minutos.

3.5.3. Viabilidad de las formulaciones líquidas

A las formulaciones líquidas que se desarrollaron en el laboratorio se les realizó una evaluación de UFC (Unidades formadoras de colonia) por mililitro cada mes durante cuatro meses por medio del método de dilución seriada en placa. Esta evaluación se realizó con el fin de determinar la viabilidad de las formulaciones en el tiempo (Moreno, 2005; Zuñiga, 2005).

La medición de unidades formadoras de colonia se realizó a las formulaciones desarrolladas con base en agua, aceite y emulsión de *L. casei*. Para ello se tomó 1 mL de la muestra y se disolvió en 9 mL de su vehículo respectivo (Tabla 4). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} (Figura 3) y se platearon 100 μ L de las diluciones 10^{-5} a 10^{-7} por vaciado en superficie en agar MRS por triplicado. Las cajas Petri fueron incubadas a 28°C por 24 h para el conteo de unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL).

Figura 3. Método de diluciones seriadas en placa.

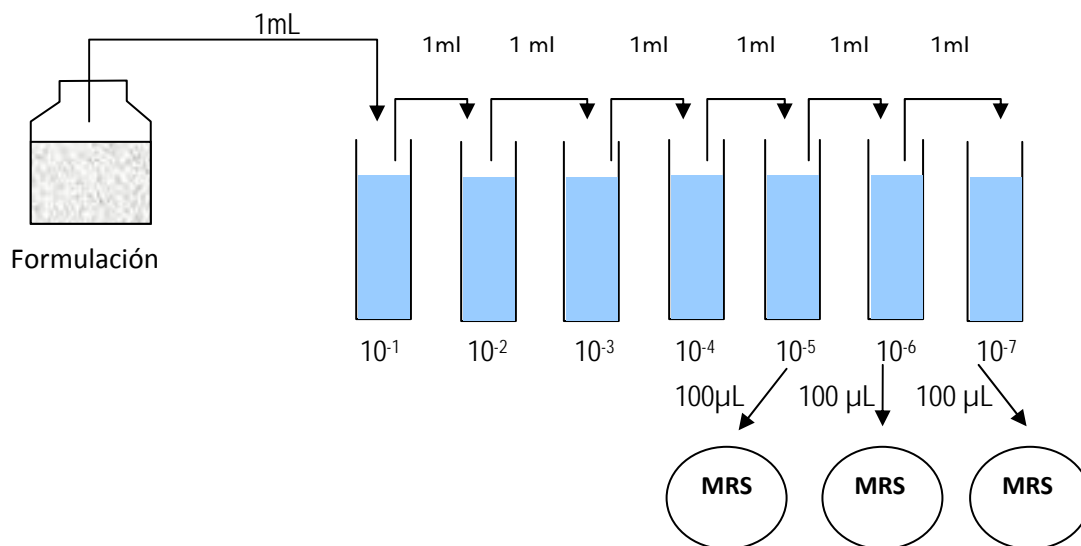


Tabla 4. Formulaciones líquidas con sus respectivos vehículos

Formulación líquida	Vehículo (9 mL)
Agua	Agua
Aceite	Aceite
Emulsión	Aceite

3.6. ENSILAJE DEL CONTENIDO RUMINAL

3.6.1. Contenido ruminal

El contenido ruminal utilizado durante este proyecto provino de la planta de sacrificio de bovinos de FrigoColanta, el cual es un subproducto del proceso (Figura 4). Para ello las vacas se insensibilizan y a partir de ese momento comienza el sacrificio de ellas, cuando retiran las vísceras y los estómagos, el rumen y el abomaso se mezclan y con un proceso de adición de agua y aire se transportan a otro depósito de la planta donde se almacenan en costales y pierden humedad.

Una vez almacenado el contenido ruminal, se tomaron los costales que tenían un menor contenido de humedad, se abrieron y se apiló el material para luego ensilarlo en bolsas de polietileno (Figura 4 y 5). Finalizado el ensilaje, las bolsas se dejaron en este depósito el cual se encontraba con mallas a los alrededores y un techo; la temperatura ambiente a la cual se almacenaron las bolsas fue de 16°C aproximadamente.

Figura 4. Contenido ruminal proveniente de la planta de sacrificio de FrigoColanta.



3.6.2. Diseño metodológico

En la planta de FrigoColanta se realizó el ensilaje del contenido ruminal proveniente del sacrificio del ganado bovino en bolsas de polietileno (Figura 5). Esta ruminaza fue transportada a un lugar aislado dentro de la planta con el fin de evitar el problema de contaminación cruzada.

Figura 5. Ensilaje del contenido ruminal.



3.6.2.1. Primer proceso de ensilaje: al ensilado del contenido ruminal de las vacas se le realizó un diseño de experimentos unifactorial donde el factor a evaluar fue el tipo de formulación con cinco niveles por cuadruplicado (Tabla 5). Las formulaciones líquidas fueron aquellas desarrolladas en el proyecto (agua, aceite, emulsión), adicionalmente se evaluó un producto comercial y se realizó un control sin inoculación alguna.

Tabla 5. Diseño experimental unifactorial

Formulación	Agua	Aceite	Emulsión	Sill All	Control
VARIABLES DE RESPUESTA	Olor, color, pH, análisis bromatológicos				

El ensilaje se realizó en bolsas de polietileno, donde se introdujeron 52 Kg de ruminaza y 1 Kg de melaza como fuente de carbono. En cada bolsa se adicionaron las diferentes dosis de cada formulación: 104 mL de agua, 104 mL del aceite, 104 mL de la emulsión y 104 mL del Sill All, respectivamente. Al control negativo no se le adicionó ninguna solución. Las bolsas se cerraron completamente con cabuya y se eliminó toda la cantidad de aire posible. Se almacenaron durante 30 días a una temperatura ambiente aproximada de 16°C en un cuarto techado. Una vez finalizado el proceso de ensilaje, se tomaron muestras compuestas, es decir, de cada una de las bolsas ensiladas para cada formulación se tomaron 125 gr. y se mezclaron hasta completar 500 gr. de la muestra. Las cinco muestras (formulación agua, aceite, emulsión, Sill All y control) se llevaron al laboratorio de la planta de concentrados de Colanta en Itaguí para realizar el análisis bromatológico. A las muestras compuestas también se les determinó el valor de pH con un pHmetro marca WTW, y cualitativamente se determinó su color y olor según la tabla de olores y colores (ver anexo C).

3.6.2.2. Segundo proceso de ensilaje: en el segundo ensilaje se variaron las dosis de la formulación que mejor resultado arrojó en el primer proceso de ensilaje, en este caso fue la emulsión aceite en agua, y se comparó con diferentes dosis del producto comercial Sill All.

Los diferentes porcentajes de inoculación de la emulsión se realizaron tomando como base la concentración de bacterias ácido lácticas que contiene el Sill All. En este producto, el total de bacterias es de 9.9×10^{10} UFC/g, su presentación es en

polvo y recomiendan disolver 250 gr. en 50 litros de agua potable. Entre otras recomendaciones del producto comercial señalan que se deben agregar 2 litros por tonelada de ensilaje para forrajes con alto contenido de humedad. En nuestro ensilaje cada bolsa tenía una capacidad de 52 Kg, por lo tanto en el primer ensilaje realizado se adicionaron 104 mL de formulación líquida a cada bolsa. Para el segundo ensilaje se inoculó la emulsión con un volumen de 55 mL.

Para realizar la dosificación del Sill All, se inoculó con un porcentaje del 25% por encima y por debajo del valor establecido por las UFC, 104 mL; para la emulsión se realizó el mismo procedimiento. En la Tabla 6 se muestran las diferentes dosis aplicadas en el ensilaje.

Tabla 6. Porcentajes de inoculación para el producto comercial y la formulación líquida.

% de inoculación	Sill All (mL)	Emulsión (mL)	UFC/g ensilado
1	78	40	$3,79 \cdot 10^{10}$
2	104	55	$5,21 \cdot 10^{10}$
3	130	70	$6,64 \cdot 10^{10}$

Se realizó un diseño de experimentos multifactorial, con dos factores: el tipo de formulación (emulsión, Sill All) y el grado de inoculación (I1, I2, I3) por cuadruplicado (Tabla 7). Las variables de respuesta fueron las mencionadas anteriormente en la Tabla 5. Adicionalmente se realizó un análisis unifactorial para realizar una comparación entre el producto comercial, la emulsión y el control.

Tabla 7. Evaluación de la formulación con diferentes niveles de inoculación.

Formulación líquida			Producto comercial (Sill All)		
I1	I2	I3	I1	I2	I3

El ensilaje se realizó en bolsas de polietileno bajo las mismas condiciones que el ensilaje anterior, se adicionó 1Kg de melaza a cada bolsa que contenía 52 Kg de contenido ruminal, se adicionaron las diferentes dosis de la emulsión, del Sill All y se realizó un control negativo. Las bolsas se cerraron con cabuya y se dejaron allí durante 35 días, a temperatura ambiente (aproximadamente 16°C) en un cuarto techado. Al cabo de este tiempo, se tomaron las muestras compuestas de igual forma que en el numeral anterior para la determinación de pH, olor, color y realización de los análisis bromatológicos. Finalmente, las bolsas ensiladas fueron transportadas a una finca lechera en el municipio de Don Matías donde se realizaron las pruebas de consumo en novillas de levante.

3.6.3. Análisis bromatológico

Las muestras del contenido ruminal ensilado fueron analizadas en el laboratorio de la planta de concentrados de Colanta, allí se realizó el análisis bromatológico a cada una de las muestras.

Se analizaron diferentes parámetros nutricionales y se utilizaron diferentes métodos basados en la norma técnica colombiana: pH, % acidez, % materia seca (NTC 4888), % humedad (NTC 4888), % proteína (NTC 4657), % cenizas (NTC 4648), % FDA (Fibra en detergente ácida) y % FDN (Fibra en detergente neutra).

3.6.4. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% en Statgraphics plus 5.1., donde se utilizó como método estadístico LSD de Fisher (Mínima diferencia significativa), la prueba de rangos múltiples, la prueba de Skewness y Kurtosis, y la prueba de Bartlett para determinar diferencias significativas en cada proceso del ensilaje. Se planteó la siguiente hipótesis:

Ho (Hipótesis nula): Existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en el primer ensilaje, si $p < 0.05$ se rechaza la hipótesis.

La hipótesis nula afirma que los promedios de cada formulación son iguales ($\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$). Si esta hipótesis es rechazada ($p < 0.05$) significa que si hay diferencias significativas entre los tratamientos y por ende se realizan pruebas de rangos múltiples para determinar entre cuales tratamientos hay diferencias.

La prueba de Skewness y Kurtosis fue usada para comprobar el supuesto de población normalmente distribuída. La prueba de Bartlett de igualdad de varianza fue usada para comprobar la homogeneidad de la varianza ($p > 0.05$: varianza sin diferencias significativas), esta prueba es muy sensible al supuesto de normalidad, por consiguiente, cuando la validez de este supuesto está en duda, no se debe usar (Montgomery, 2006).

3.6.5. Pruebas de consumo

Una vez finalizado el segundo ensilaje realizado con diferentes porcentajes de inoculación de la emulsión y el producto comercial Sill All, las bolsas se llevaron a Don Matías, allí se abrieron y se midió el pH con un pHmetro suministrado por la planta, se realizó la evaluación cualitativa del olor y el color y se tomaron muestras

de 500 gr. cada una para llevar al laboratorio de la planta de concentrados donde se realizaron los análisis bromatológicos. Se tomaron 2 Kg de cada ensilado y se dispusieron en comederos para el consumo de las vacas.

El contenido ruminal ensilado se dispuso para los animales en una hora en la cual las novillas acostumbran comer, esto con el fin de recibir una buena aceptación del alimento por parte del ganado.

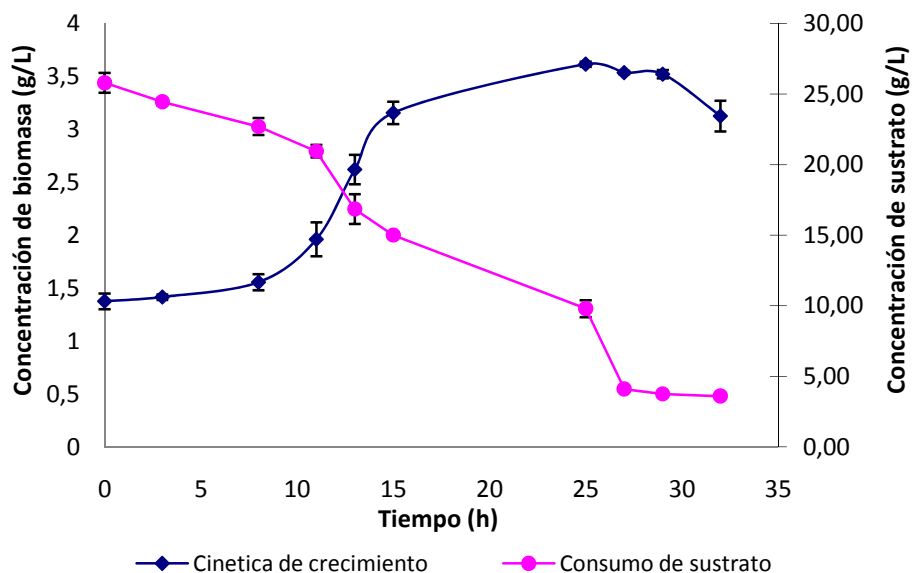
En estas pruebas de consumo se evaluaron los kilogramos de producto ensilado consumido por parte del ganado en una ración y observó su comportamiento.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Lactobacillus casei*

La cinética de crecimiento y de consumo de sustrato para *L. casei* puede observarse claramente en la Figura 6 y sus respectivos datos en el anexo D.

Figura 6. Crecimiento celular y consumo de sustrato para *Lactobacillus casei*.



* Barras verticales: Error estándar

La cinética de crecimiento del *Lactobacillus casei* presentó una tendencia exponencial mostrando claramente cada una de las etapas del crecimiento microbiano. En la Figura 3, se observa que la fase de latencia tuvo una duración de 8 horas aproximadamente, probablemente muy extensa por la edad del

preinóculo la cual podría estar en la fase de muerte celular, según lo observado en esta cinética. Una vez finalizada esta etapa, comienza un crecimiento acelerado de las células en la fase exponencial la cual finalizó aproximadamente a las 25 horas. Durante esta fase, dado que la fermentación se realizó en condiciones aerobias, las células comenzaron a duplicarse con el fin de producir biomasa, y se presentó la máxima velocidad de crecimiento del microorganismo. Al finalizar esta fase el *L.casei* agotó todos los nutrientes necesarios para su desarrollo, pasando a la fase estacionaria donde paró el crecimiento y a las 32 horas el microorganismo cayó en la fase de muerte donde algunas células perdieron su viabilidad (Doran, 2002).

La mayor concentración de biomasa que se obtuvo fue de $3.62 \text{ g/L} \pm 0.03$ a las 25 horas de la fermentación. Esta concentración es menor a la reportada por Vargas *et al.* (2004), sin embargo ellos trabajaron con diferentes cepas de *Lactobacillus* y formularon tres medios de cultivos con diferentes composiciones con el fin de seleccionar el que presentara una mayor productividad celular. Los tres medios de cultivo propuestos contenían una cantidad mínima de sales (KH_2PO_4 , NH_4Cl , Na_2SO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , MgCl_2), en el primer medio se utilizó melaza de caña y extracto de levadura, en el segundo medio utilizaron agua residual del proceso de pasteurización UHT (Ultra High Temperature) y extracto de levadura y finalmente el tercer medio contenía melaza de caña, extracto de levadura y peptona caseína. En este último se observó el mayor crecimiento celular ya que según Luedeking (2000), las fermentaciones ácido lácticas aumentan su eficiencia utilizando peptona caseína como fuente de proteína, además del extracto de levadura. Con este último medio de cultivo obtuvieron una concentración de *Lactobacillus* de 5.5 g/L en 48 horas de fermentación realizada en shaker a 37°C , y en el primer medio donde sólo se utilizó extracto de levadura como fuente de proteína obtuvieron una concentración celular de 4.5 g/L . La menor concentración de biomasa obtenida se debe a que en dicho trabajo los autores utilizaron una mayor cantidad de proteína, extracto de levadura y peptona caseína, y como

fuente de carbono utilizaron melaza de caña, la cual es más económica que la glucosa.

El extracto de levadura contiene muchos aminoácidos que son fuentes de nitrógeno muy apetecidas por los microorganismos y pueden tener funciones de crecimiento para el mismo. Algunas bacterias crecen más rápido cuando se proporcionan uno o más aminoácidos en forma peptídica, lo cual se atribuye al efecto antagonista de algunos aminoácidos en el consumo de otros (Asenjo y Merchuk, 1995). En el caso de *Lactobacillus delbrueckii* por ejemplo, el consumo de serina es antagonizado por el D y L – alanina (Prescott *et al.*, 1953).

La concentración de extracto de levadura utilizada en el agar MRS fue de 10 g/L, generalmente las concentraciones de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo se encuentran entre 10 y 25 g/L, mostrando que la adición de nutrientes y concentraciones mas altas de estos tienen un efecto positivo en la producción de ácido láctico. Con solo extracto de levadura se obtiene mayor producción de ácido láctico que con extracto de levadura y peptona, ambas en bajas cantidades, pero lo opuesto ocurre cuando la concentración de extracto de levadura se mantiene constante y adiciona peptona (Amrane y Prigent, 1997).

La Figura 6 muestra la cinética de consumo de glucosa por parte del microorganismo, la cual se relacionó de forma inversa con el crecimiento microbiano ya que a medida que se produjo biomasa, el microorganismo fue consumiendo la fuente de carbono para su crecimiento, síntesis de ácido láctico y para sus actividades de mantenimiento (Doran, 2002). Una vez el microorganismo alcanzó la fase estacionaria no hubo más consumo de glucosa.

La concentración inicial de glucosa fue de 25.80 g/L y a las 32 horas de fermentación llegó a 3.60 g/L, lo que equivale a un consumo de sustrato de 86.05%.

El rendimiento observado de sustrato en biomasa (Y'_{xs}) se obtuvo utilizando la ecuación 6:

$$Y'_{xs} = \frac{-dX}{dS} \quad \text{Ecuación 6}$$

Se realizó una gráfica de concentración de biomasa vs consumo de sustrato con los datos de la fermentación de la fase exponencial, se realizó una línea de tendencia lineal y el valor de la pendiente fue de 0.096 g biomasa/g sustrato, lo que indica que este fue el valor de Y'_{xs} obtenido en la fermentación. En un estudio realizado por Suárez, 2007 para la producción de ácido láctico en condiciones microaerófilas, se obtuvo un rendimiento Y'_{xs} de 0.056 g biomasa/g sustrato para *Lactobacillus casei* con una concentración de carbonato de calcio de 15 g/L. En otras fermentaciones aerobias se han obtenido rendimientos entre 0.44-0.51 g biomasa/g sustrato con glucosa como fuente de carbono (Doran, 2002). Este rendimiento es bajo respecto al reportado por Doran ya que al realizar la fermentación en un shaker, el sistema no estuvo en condiciones óptimas de aerobiosis, y al tratarse de un microorganismo anaerobio facultativo, puede ser que el ácido pirúvico producido en el proceso de glucólisis se haya reducido mediante fermentación láctica a ácido láctico (Pelczar, 1984) consumiendo un alto contenido de sustrato.

4.2. DESARROLLO DE FORMULACIONES LÍQUIDAS

4.2.1. Pruebas preliminares

4.2.1.1. Formulación líquida en agua: se realizaron ensayos variando la concentración de CMC (0.05%, 0.3% y 0.5%). Se agitó en plancha a 1500 rpm y el

tiempo necesario para que se homogenizara la mezcla fue de 11, 20 y 34 minutos respectivamente. A una concentración de 0.3% y 0.5% las células permanecieron suspendidas en el agua, lo que no sucedió a 0.05%. La formulación en agua se realizó con CMC 0.3% ya que el tiempo de mezclado y la cantidad de material que se requiere es menor que con una concentración de 0.5%.

4.2.1.2. Formulación líquida en aceite: en esta formulación se realizaron ensayos con CMC a diferentes concentraciones (0.1%, 0.05%), pero debido a que este dispersante no es soluble en el aceite, sólo se utilizó como vehículo el aceite.

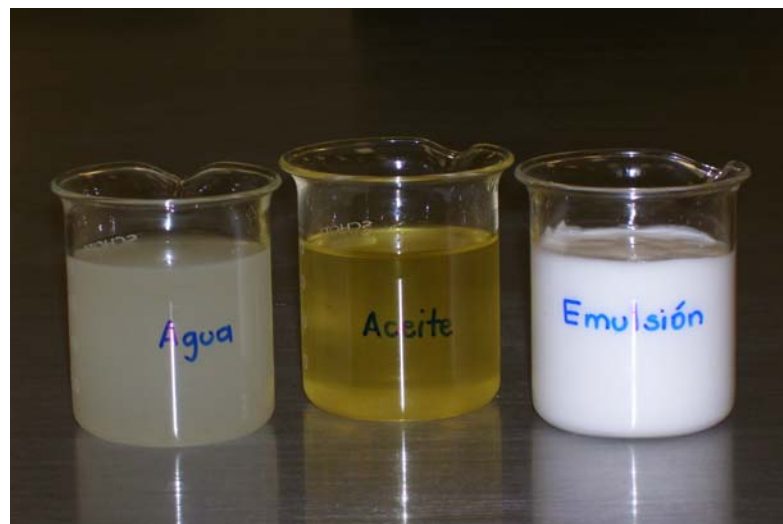
4.2.1.3. Formulación líquida en emulsión aceite en agua: para lograr la emulsión se ensayaron diferentes cantidades de goma xantana (0.5%, 0.4%, 0.3%), con esta última concentración se logró una buena homogenización, con los otros valores no fue posible ya que al ser un agente espesante se observó una alta viscosidad. Inicialmente, con el Tween 20 se ensayó una concentración del 2% pero también se disminuyó este valor a 1.2% para hacer la emulsión menos espesa.

La Figura 7 muestra las formulaciones líquidas desarrolladas en el laboratorio (agua, aceite y emulsión) y la Tabla 8 muestra las características físicas y biológicas de cada una de ellas.

Tabla 8. Características físicas y biológicas de las formulaciones líquidas.

	FORMULACIONES LÍQUIDAS		
	Agua con CMC	Aceite vegetal	Emulsión agua en aceite
Estado físico	Líquido	Líquido	Líquido
Color	Turbio	Amarillo claro	Blanco
Olor	Inoloro	Característico	Característico
pH	6.37	4.93	5.01
Viscosidad (cP) a 20°C	4.05	79.2	1028
Densidad (g/cm³) a 20°C	0.980	0.838	0.932
UFC/mL	1.81*10 ⁹	1.77*10 ⁹	1.85*10 ⁹

Figura 7. Formulaciones líquidas con *Lactobacillus casei*.



4.2.2. Viabilidad de las formulaciones líquidas

La determinación de la viabilidad de las formulaciones líquidas es de gran importancia a la hora de comercializar un producto y de cumplir con las normas técnicas ICA, según la resolución 0375 del 2004 por la cual se dictan las disposiciones sobre registro y control de los bioinsumos y los extractos vegetales de uso agrícola en Colombia. Para ello, se realiza periódicamente la evaluación de UFC/mL en el tiempo con el fin de garantizar la viabilidad del producto.

La Figura 8 y la Tabla 9 muestran el comportamiento de las unidades formadoras de colonias en el tiempo durante 4 meses de las tres formulaciones líquidas desarrolladas. Las formulaciones se evaluaron en este tiempo a una temperatura ambiente (25°C) y a 4°C.

Figura 8. Viabilidad de *L. casei* en diferentes formulaciones.

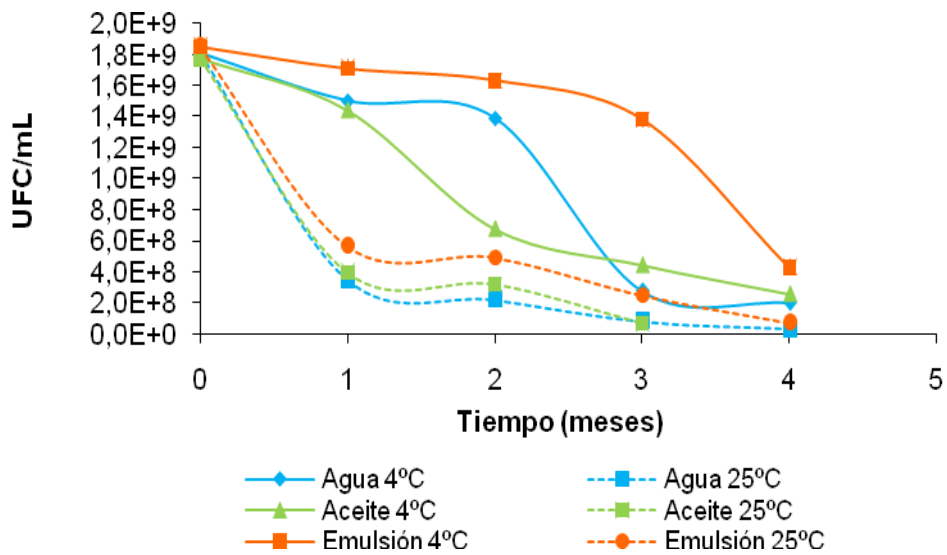


Tabla 9. Porcentaje de reducción de cada formulación líquida a diferentes temperaturas.

Tiempo (meses)	UFC/mL					
	Agua		Aceite		Emulsión	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
% reducción	88,84	98,29	85,59	96,16	76,97	96,11

A 25°C el agua y el aceite disminuyeron rápidamente la cantidad de UFC/ mL llegando a un orden de 10^7 UFC/mL, este es un valor no viable para el desarrollo de formulaciones líquidas ya que según Zuñiga, 2005 estas deben tener una concentración de biomasa de 10^8 UFC/mL al ser determinadas por el método de dilución en placa y se considera una fecha de vencimiento entre 3 y 5 meses.

En el último mes no fue posible contar las UFC/mL del aceite a 25°C debido a que la formulación ya se encontraba contaminada, se observaron unos hongos amarillos alrededor de la placa.

A 25°C en la emulsión se obtuvo un porcentaje de reducción de las UFC/mL del 96.11%, en esta formulación se observó un pronunciado decrecimiento de UFC/mL en el último mes, alcanzando un orden de 10^7 UFC/mL.

En general en las tres formulaciones líquidas evaluadas el porcentaje de reducción de UFC/mL fue mayor cuando el producto estaba a temperatura ambiente.

A 4°C los resultados obtenidos fueron mejores que a 25°C; para el agua, el aceite y la emulsión se obtuvo un porcentaje de reducción de UFC/mL del 88.84%, 85.59% y 76.97% respectivamente, en las tres formulaciones se alcanzó un orden de 10^8 UFC/mL, lo cual indica que fue diez veces mayor el número de unidades formadoras de colonias a 4°C que a temperatura ambiente.

Al finalizar el tiempo de evaluación de las formulaciones líquidas, la emulsión fue la que presentó los mejores resultados ya que a 4°C se obtuvo un valor de $4,26 \cdot 10^8$ UFC/mL, mayor a las otras formulaciones.

Las formulaciones líquidas conservadas a 4°C presentaron mejores resultados de viabilidad ya que a esta temperatura se da la gelificación de la membrana plasmática y el transporte se hace tan lento que no hay crecimiento del microorganismo (Madigan *et al.*, 2004), por lo tanto la bacteria se conserva adecuadamente en estas condiciones.

Las membranas contienen tanto proteínas como lípidos, la mayoría de ellos asociados a membranas son estructuralmente asimétricos, con extremos polares hidrofílicos y no polares hidrofóbicos. Esta propiedad de los lípidos les confiere la capacidad de formar membranas en bicapa (Prescott, 2002). El aceite mineral forma una capa que protege el microorganismo, por lo tanto la transferencia de oxígeno entre el medio externo y el *L. casei* disminuye, y por esto el microorganismo se encuentra latente. Este fenómeno también podría estar ocurriendo con el aceite vegetal, y por esta razón se dio una mejor viabilidad de las células en la emulsión, que adicionalmente contiene un gelificante (goma xantana) y Tween 20 que puede hacer mas compacta esta capa.

4.3. ENSILAJE DEL CONTENIDO RUMINAL

4.3.1. Primer proceso de ensilaje

4.3.1.1. Análisis unifactorial del primer ensilaje: El contenido ruminal ensilado bajo el primer diseño de experimentos fue analizado según sus características físicas y nutricionales, y sus resultados se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de las características físicas y nutricionales del primer ensilaje.

Formulación	pH	Olor	Color	% Materia Seca	% Humedad	% Proteína	% Cenizas	% FDA	% FDN
Agua (W)	4.75(b)	3.33(b)	3.33(b)	22.49 (b)	77.51(c)	4.60(c)	3.40(b)	8.21(a)	11.93(a)
Aceite (O)	4.34(a)	3(c)	3(c)	27.59(c)	72.38(b)	2.46(ab)	3.35 (b)	9.77(c)	16.06(c)
Emulsión (E)	4.11(a)	1.5(b)	1.5(b)	28.49(c)	71.51(b)	3.42(bc)	3.68(b)	9.32(bc)	13.83(b)
Control (C)	4.29(a)	2.33(a)	2.33(a)	31.24(d)	68.76(a)	2.80(ab)	3.40(b)	8.912(b)	14.33(b)
SIII AII (S)	5.01(c)	4.5(c)	4.5(c)	15.86(a)	84.14(d)	1.53(a)	2.26(a)	8.71(ab)	11.55(a)
Valor p	0.0003	0.0097	0.0097	0.00	0.00	0.0398	0.01	0.0153	0.0029

* Los valores sombreados son los mejores resultados de cada ensayo.

*Letras diferentes representan diferencias significativas.

Para las variables fisicoquímicas y nutricionales evaluadas, el valor p es menor que el valor de significancia $\alpha = 0.05$ (Tabla 10 y anexo E) por lo que se puede decir que el tipo de formulación tiene un efecto estadísticamente significativo sobre las variables evaluadas.

El rango óptimo establecido para el valor de pH en un ensilaje de buena calidad está entre 3.8 – 4.2 (Bernal y Chaverra, 2000). En una investigación realizada por Trillos *et al.*, 2007, en la cual ensilan el contenido ruminal con harina de sorgo, se obtuvo un pH de 4.2, este valor es cercano al obtenido en la presente investigación. A medida que disminuye el pH se hace más eficiente el proceso del ensilaje ya que la acidez de los pH bajos contribuyen a la conservación del ensilaje evitando la descomposición del mismo (Trillos *et al.*, 2007).

Para el olor y el color, entre más cercano a uno sea el valor va a indicar una mejor calidad del ensilaje. Para realizar el ensilaje del contenido ruminal es necesario que no haya material de color negro que puede indicar una mala calidad del ensilaje (Colanta, 2007).

El contenido de materia seca desempeña un papel fundamental en el ensilaje ya que este aumenta la concentración de nutrientes, facilita los procesos fermentativos y disminuye la capacidad de acción de los clostridios (Soto *et al.* 2002). Según Bertoia, 2004, el rango óptimo de materia seca del ensilado debe estar entre 30 – 35% para ser considerado como un ensilaje de buena calidad. Si se obtienen bajos valores de este parámetro nutricional se produce una disminución en la digestibilidad como consecuencia de la pérdida en los jugos de algunos componentes digestibles (Soto *et al.*, 2002). En la literatura se han reportado valores de materia seca entre un 23% y 25% (Karlen *et al.*, 1985; Soto *et al.*, 2002) para granos.

El contenido de humedad óptimo en ensilaje de forrajes debe estar entre 60-70% según Bertoia, 2004. En un estudio realizado por Trillos *et al.*, 2007, se registran valores de humedad entre 37.08 – 42.97%, y un valor similar (43%) fue reportado por Sabogal *et al.* 1987. En ensilajes con un alto contenido de humedad se producen mayores cantidades de efluentes que son responsables de la pérdida de nutrientes altamente digestibles (Soto *et al.* 2002), además los ensilajes muy húmedos son indeseables desde el punto de vista nutricional, porque el consumo de materia seca suele ser bajo (Uriarte, 2004).

Un alimento o una dieta debe contener aproximadamente un 7% de proteína para garantizar nitrógeno suficiente para una fermentación microbiana efectiva en el rúmen (Oramas y Vivas, 2007). En otros estudios se han reportado valores de proteína para el contenido ruminal seco 8.74-10.62% (Trillos *et al.*, 2007).

La ceniza es el residuo remanente luego que toda la materia orgánica presente en una muestra es completamente incinerada. Consiste de toda la materia orgánica

(o minerales) del alimento, así como los contaminantes orgánicos, tales como tierra y arena (García *et al.*, 2005). En la literatura se reportan valores del contenido de cenizas de 2.86 - 3.55% para un ensilaje de contenido ruminal y harina de sorgo (Trillos *et al.*, 2007). Estos bajos valores de ceniza obtenidos en este estudio indican que no hubo una alta presencia de contaminantes orgánicos en el ensilaje.

La fibra detergente neutra (FDN) está compuesta de hemicelulosa, celulosa y lignina. La celulosa y hemicelulosa de los forrajes son completamente digestibles, pero la lignina es casi indigerible y su presencia puede inhibir total o parcialmente la digestión de los otros constituyentes orgánicos (Bertoia, 2004). En la literatura se han reportado valores de 73.39% (Rivas *et al.*, 2006) y 47-60.9% (Nuñez *et al.*, 2005) para granos. Otros estudios han reportado valores de 42.9% y 54.6% para maíz en clima frío (Gohl, 1982; Blaser, 1986 y Knowlton *et al.*, 1993). Aunque los valores obtenidos están por debajo de los reportados, un bajo contenido de FDN puede garantizar un buen ensilaje, porque según Chalupa *et al.* (1996), la FDN estima la capacidad de los alimentos de ocupar volumen en el tracto gastrointestinal, por lo que generalmente se asocia con el llenado físico del animal, y al aumentar los valores de FDN, el consumo total de ensilado disminuye.

La fibra detergente ácida (FDA) incluye celulosa y lignina y como se mencionó anteriormente esta última es casi indigerible y su presencia puede inhibir total o parcialmente la digestión de los otros constituyentes orgánicos (Bertoia, 2004). Entre algunos de los datos reportados se encuentra Archila, 1989 que obtuvo 46.01% de FDA y Rivas *et al.* (2006) con 43.63% para granos. En otros estudios realizados se han reportado valores de 25.8%, 32%, 27% y 30.3% FDA para maíz en clima frío y valores de 35.4% y 32.9% para maíz en clima cálido, ambos realizados en Colombia (Blaser, 1986; Laredo y Kleermann, 1990; Díaz, 1986; Knowlton *et al.*, 1993 y Staples *et al.*, 1993). Los valores obtenidos de FDA en este estudio están por debajo de los datos reportados, pero como la FDA se correlaciona negativamente con la disponibilidad de energía del forraje (Di Nucci *et*

al., 2004), se puede decir que bajos valores de FDA aumentan la digestibilidad del alimento y la energía que contendrá.

Según el análisis fisicoquímico, la emulsión y el control fueron los tratamientos que presentaron los mejores resultados de pH, olor y color; el agua presentó los mayores niveles de proteína, y los menores niveles de FDN y FDA; y el control los mayores niveles de materia seca correspondiente a los menores niveles de humedad.

Según estos resultados, se determinó que la emulsión arrojó los mejores resultados en cuanto a los parámetros fisicoquímicos, y unos valores intermedios para los resultados de los análisis bromatológicos. El valor del pH es el principal indicativo de la calidad de un ensilaje ya que si es bajo se asegura que se realizó una buena fermentación ácido láctica donde no hay presencia de microorganismos patógenos, los cuales generalmente crecen a pH mayores de 5. Por esta razón se realizaron las siguientes pruebas con esta formulación y con el Sill All por ser el producto comercial.

4.3.2. Segundo proceso de ensilaje

4.3.2.1. Análisis multifactorial del segundo ensilaje: el contenido ruminal ensilado bajo el segundo diseño de experimentos multifactorial fue analizado según sus características físicas y nutricionales, y sus resultados se detallan en la Tabla 11. En este ensilaje se varió la dosis de la emulsión y se comparó con diferentes dosis del Sill All.

Tabla 11. Resultados de las características físicas y nutricionales del segundo ensilaje.

Formulación	pH	Olor	Color	% Materia Seca	% Humedad	% Proteína	% Ceniza	% FDA	% FDN
Emulsión(E)	4.65(a)	1.78(a)	1.78(a)	20.84(a)	79.16(a)	2.91(a)	3.05(a)	7.95(b)	11.54(b)
Sill All (S)	4.67(a)	2.78(b)	2.78(b)	19.02(a)	80.98(a)	2.97(a)	2.98(a)	6.92(a)	10.7(a)
Valor p	0,79	0,002	0,002	0,1	0,1	0,58	0,64	0,0001	0,0042
Dosificación									
I1	4.54(a)	2(a)	3(a)	20.55(a)	79.45(a)	2.47(a)	3.34(b)	7.53(a)	10.77(a)
I2	4.75(b)	2.17(ab)	2.17(ab)	18.54(a)	81.46(a)	3.06(a)	2.79(a)	7.17(a)	10.55(a)
I3	4.7(ab)	2.67(b)	2.67(b)	20.71(a)	79.29(a)	3.3(a)	2.93(ab)	7.61(a)	12.05(b)
Valor p	0,067	0,115	0,115	0,197	0,197	0,0009	0,0521	0,386	0,0012
Valor p interacción	0,094	0,565	0,565	0,6489	0,6489	0	0,4048	0,0169	0,2156

*Los valores sombreados son los mejores resultados de cada ensayo.

*Letras diferentes representan diferencias significativas.

Para las formulaciones líquidas evaluadas, el valor p es menor que el valor de significancia $\alpha = 0.05$ para el color, olor, %FDA, %FDN (anexo F) por lo que se puede decir que el tipo de formulación tiene un efecto estadísticamente significativo sobre las variables evaluadas.

Para las diferentes dosificaciones evaluadas, se encontró que existe un efecto estadísticamente significativo para las variables proteína y %FDN (anexo F).

4.3.2.2. Análisis unifactorial: Se realizó este análisis con el fin de comparar el producto comercial Sill All, la emulsión y el control. La tabla 12 muestra los resultados de las características físicas y nutricionales del segundo ensilaje bajo un diseño de experimentos unifactorial.

Tabla 12. Resultados de las características físicas y nutricionales del segundo ensilaje bajo un diseño de experimentos unifactorial.

Formulación	pH	Olor	Color	% Materia Seca	% Humedad	% Proteína	% Cenizas	% FDA	% FDN
Emulsión I1 (EI1)	4.51(a)	1.67(a)	1.67(a)	21.33(a)	78.67(a)	1.59(a)	3.29(a)	7.87(a)	11.32(a)
Emulsión I2 (EI2)	4.65(a)	1.67(a)	1.67(a)	18.96(a)	81.04(a)	3.49(a)	2.76(a)	8.02(a)	11.10(a)
Emulsión I3 (EI3)	4.80(a)	2(a)	2(a)	22.24(a)	77.77(a)	3.67(a)	3.12(a)	7.98(a)	12.21(a)
Sill All I1 (SI1)	4.56(a)	2.33(a)	2.33(a)	19.77(a)	80.24(a)	3.35(a)	3.39(a)	7.18(a)	10.72(a)
Sill All I2 (SI2)	4.86(a)	2.67(a)	2.67(a)	18.12(a)	81.89(a)	2.64(a)	2.81(a)	6.33(a)	9.99(a)
Sill All I3 (SI3)	4.60(a)	3.33(a)	3.33(a)	19.19(a)	80.82(a)	2.92(a)	2.74(a)	7.25(a)	11.90(a)
Control	4.69(a)	2.67(a)	2.67(a)	22.80(a)	77.21(a)	3.10(a)	3.26(a)	7.71(a)	11.99(a)
VALOR p	0.1038	0.017	0.017	0.1205	0.1205	0	0.1129	0.0008	0.0008

*Los valores sombreados son los mejores resultados de cada ensayo.

*Letras diferentes representan diferencias significativas.

Para las variables color, olor, proteína, %FDA, %FDN, el valor p es menor que el valor de significancia $\alpha = 0.05$ (Tabla 12 y anexo G) por lo que se puede decir que el tipo de formulación tiene un efecto estadísticamente significativo sobre las variables evaluadas.

Según el análisis fisicoquímico, la emulsión con los niveles de dosificación I1, I2 fueron los tratamientos que presentaron los mejores resultados de pH, olor y color; el control presentó los mejores valores de materia seca y humedad; la emulsión con el nivel I3 obtuvo el mayor valor de proteína; y los menores valores de FDN y FDA fueron reportados por el Sill All con inoculación I2, I1 respectivamente.

Con estos resultados no se tiene una formulación con una dosis óptima para ensilar el contenido ruminal ya que los resultados no dependieron de la inoculación. Los resultados obtenidos en cada parámetro evaluado son similares a los valores obtenidos con el control, esto indica que la dosis aplicada no tiene un efecto significativo en el ensilaje ya que el contenido ruminal contiene una gran cantidad de microorganismos que pueden competir con el *Lactobacillus casei* e inhibir su crecimiento.

4.3.3. Pruebas de consumo

Al finalizar el tiempo de ensilaje del contenido ruminal, el material se llevó a una finca lechera donde se realizaron las pruebas de consumo. El contenido ruminal ensilado se dispuso en nueve comederos para 16 novillas Holstein y 4 novillas F1 Jersey x Holstein, de 18 a 24 meses de edad y con peso entre 300 y 350 Kg., a una hora a la cual acostumbran a consumir alimento concentrado. La alimentación básica del grupo de animales es forraje de pasto kikuyo fertilizado y gramas nativas, sal mineralizada del 4% de fósforo y agua a voluntad. Se les suministra 1 Kg. de alimento concentrado diariamente por cada animal.

Ante la prueba de consumo se encontró baja palatabilidad del contenido ruminal, este término se refiere al grado de aceptación del animal en cuanto al sabor, olor y textura del alimento. Las novillas evaluadas demostraron rechazo a las características organolépticas del contenido ruminal y no presentaron consumo del producto (Figura 17).

El contenido ruminal contiene un olor característico el cual no es muy agradable, después de la fermentación se obtuvo un ligero olor a fermentado. El color que se obtuvo fue marrón claro, pero dada la apariencia de este material no se logró que el producto fuera llamativo a las novillas y por lo tanto hubo un rechazo hacia este.

Se probó otro método con el fin de atraer a las novillas adicionando 5 Kg de concentrado para favorecer la prueba, algunas novillas se acercaban al comedero e inmediatamente se retiraban sin comer el alimento, y otras se acercaban y solamente comían de las paredes del comedero donde sólo había alimento concentrado.

Figura 17. Pruebas de consumo en ganado bovino.



CONCLUSIONES

Para el desarrollo de las formulaciones líquidas, se realizó una cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 y una cinética de consumo de sustrato durante 32 horas, obteniéndose 3.62 ± 0.03 g/L al cabo de 25 horas, un rendimiento de sustrato en biomasa (Y'_{xs}) de 0.096 g biomasa/g sustrato y un consumo de glucosa del 86.05% en matraces agitados.

Las tres formulaciones desarrolladas con base en agua, aceite y emulsión aceite en agua presentaron condiciones fisicoquímicas adecuadas para mantener la viabilidad del *L. casei* por encima de 10^7 UFC/mL después de 4 meses de evaluación. En este caso, la emulsión aceite en agua presentó las mejores condiciones para el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos, logrando obtener después de 4 meses una concentración de $4,26 \cdot 10^8$ UFC/mL a 4°C. Además, la viabilidad de los microorganismos en las formulaciones líquidas se conservó mejor a 4°C que a temperatura ambiente, debido a que a bajas temperaturas el microorganismo se inhibe sin afectar su metabolismo celular.

De las formulaciones desarrolladas con base en *L. casei* e inoculadas en el contenido ruminal del ganado bovino, ninguna logró desempeñarse mejor que el control en cuanto a los análisis fisicoquímicos (pH, olor y color). Para los análisis bromatológicos del primer ensilaje, el agua presentó los mayores niveles de proteína, y los menores niveles de FDN y FDA; y el control los mayores niveles de materia seca correspondiente a los menores niveles de humedad.

La formulación líquida con base en *L. casei* más apropiada para el ensilaje del contenido ruminal fue la emulsión aceite en agua, ya que se obtuvo el valor de pH más bajo (4.11), y el mejor valor de olor y color, indicando una buena calidad del ensilaje y una buena fermentación ácido láctica.

El segundo ensilaje del contenido ruminal muestra que la mayoría de los resultados fisicoquímicos y bromatológicos dependen de la formulación mas no del nivel de dosificación de las formulaciones en las cantidades evaluadas.

El ensilaje del contenido ruminal del ganado bovino con *L. casei*, no generó los resultados obtenidos por otros investigadores con forrajes, ya que posiblemente la ruminaza posee una gran cantidad de flora y fauna microbiana que puede competir con este microorganismo bajo dichas condiciones ambientales.

El alto nivel de humedad del contenido ruminal, luego de su transporte dentro de la planta, no favorece las condiciones para realizar un ensilaje que sea apto para el consumo animal.

En todos los procesos de ensilaje realizados, los valores de FDA y FDN obtenidos estuvieron por debajo del 13%, garantizando una buena calidad del ensilaje, ya que al obtenerse bajos valores de FDA y FDN se aumenta la disponibilidad de energía y la digestibilidad respectivamente.

El contenido ruminal ensilado es bajo en componentes nutricionales (proteína, FDA, FDN), por lo tanto no puede ser utilizado como un suplemento alimenticio para ganado bovino.

Las novillas Holstein y F1 Jersey x Holstein de 18 a 24 meses de edad rechazaron el contenido ruminal ensilado y la combinación de contenido ruminal ensilado- concentrado.

RECOMENDACIONES

En la formulación del medio de cultivo para la obtención de biomasa de *L. casei*, se recomienda evaluar otras fuentes de proteína diferentes al extracto de levadura como lo es la peptona caseína, ya que según Luedeking (2000), las fermentaciones ácido lácticas aumentan su eficiencia utilizando este compuesto.

Realizar la producción de biomasa de *L. casei* en un bioreactor con buenas condiciones de aireación, en las cuales el microorganismo por ser anaerobio facultativo, pueda producir una mayor cantidad de biomasa y obtener un rendimiento de sustrato en biomasa más alto.

Evaluar la adición de urea como fuente de proteína y la adición de pasto kikuyo en un 40% al proceso de ensilaje, con el fin de aumentar los requerimientos nutricionales y la palatabilidad por parte de los bovinos, y evaluar diferentes dosis de melaza para obtener una fermentación más eficiente en dicho proceso.

Se recomienda realizar el ensilaje con una mayor cantidad de tiempo aproximadamente de 45 a 60 días, pues el contenido ruminal es muy húmedo y requiere mayor tiempo de ensilaje que los forrajes.

Utilizar silos más pequeños, que sean más resistentes a la luz solar y animales roedores y fáciles de manipular.

Reducir el contenido de humedad de la ruminaza a un 70% a la hora de realizar nuevos ensilajes ya que esto provoca apelmazamiento del material, lo cual dificulta la aplicación homogénea del inoculante y de la fuente de carbono (melaza).

Evaluar el consumo del producto ensilado en este proyecto en cerdos y pollos de engorde.

Evaluar otros aceites vegetales más económicos para el desarrollo de la emulsión aceite en agua.

BIBLIOGRAFÍA

Amrane, A.; Prigent, Y. 1997. Growth and lactic production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: influence of peptidic nitrogen deficiency. J. Biotechnol. 55. p. 1 – 8.

Archila, C. W. 1989. Evaluación nutritiva de maíz y sorgo forrajero ensilado con excreta y melaza. Tesis de MC. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. p. 113.

Alzate, R. 1994. Seminario Biotecnología en rumiantes: Las bacterias del rumen. Universidad Nacional, Medellín. p. 7 – 24.

Asenjo, J.A.; Merchuk, J.C. 1995. Bioreactor system design. Marcel Dekker, Inc. p. 94, 95.

Ashbell, G.; Weinberg, Z.G.; Azrieli, A.; Hen, Y.; Horev, B. 1991. A simple system to study the aerobic deterioration of silages. Can. Agric. Eng. 33 p. 391–394.

Ayala G.; Perea T.F. 2000. Reciclado de materiales orgánicos de desperdicio a escala industrial. Revista grupo ecológico. p. 200-209.

Aulton, M.E. 2004. Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas. Elsevier, España. p.47.

Baldwin, R.L; Allison, M.J. 1983. Rumen metabolism. Journal of Animal Science. Vol. 57 (2). p. 461-477.

Bernal, J. 1998. Conservación de forrajes. ANALAC, SENA, SAC. p. 2-2.

Bernal, J; Chaverra, H. 2000. El ensilaje en la alimentación del ganado vacuno. IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). Tercer Mundo Editores. p. 15,16, 43, 51.

Blaser, R.E. 1986. Forage animal management systems. Blacksburg, Virginia Agricultural Experimental Station. Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia: Bulletin 86-7. p. 49-61.

Botero, J.I. 1998. Biotecnología en los microorganismos del rumen. Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Medellín. p. 8, 17, 20.

Burges, H.D. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 16, 25, 58.

Cadavid C. 2001. Diseño Tecnológico para el aprovechamiento de subproductos del beneficio de bovinos en el matadero frigorífico de Coolesar. Tesis de Grado para Optar al Título de Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ingeniería. Universidad Popular del Cesar. Valledupar. Cesar. Colombia.

Chalupa, W.; Galligand, D.; Ferguson, J. 1996. Animal nutrition in the XXI century. *Animal Feed Science and Technology*: 58. p. 1-18.

Clayton, W. 1943. The theory of emulsions and their technical treatment. Cuarta edición. Blakiston company. Philadelphia. p. 110.

Conrad, R.; Ragnar, N.; Laszlo, T. 1956. Studies on Fermentation Processes in Silage: The Effect of various Carbohydrates as Supplements. From the Institute of Microbiology at the Royal Agricultural College of Sweden, Uppsala 7, Sweden. p. 376, 377.

Church, D.C. 1974. Fisiología, digestión y nutrición de los rumiantes. Volumen 1. Microbiología del rumen. Editorial Acribia. Barcelona, España. p. 184 – 225.

Cunningham, J.C. 1997. Fisiología veterinaria. México: Interamericana. p. 763.

Díaz, M. 1986. Día de campo sobre ensilaje de maíz. San Juan de Pasto, Colombia: ICA, Centro de Investigación Obonuco, Regional 5.

Doran, P. 2002. Bioprocess Engineering Principles. Elsevier Academic Press. p. 277.

Dominguez C.J.E.; Barajas C.R. 1993. Utilización del contenido ruminal en dietas integrales para borregos de engorda. Memorias del XVIII congreso nacional de Buitría. México, D. F. p. 318-320.

Duthl, J. 1989. Producción de forrajes. Segunda edición. Ediciones Mundiprensa. Madrid. p. 367.

Dukes, H.; Swenson, M.J. 1970. Fisiología de los animales domésticos. Tomo I. Funciones vegetativas. Editorial Aquilar. Madrid, España. p. 613 - 630.

Dyce, K.M.; Sack, W.O.; Wensing, J.G. 1999. Anatomía Veterinaria. Mc Graw Hill 2da edición. México. p. 952.

Febel, H.; Feteke, S. 1996. Factors influencing microbial growth and the efficiency of microbial protein synthesis: a review. In: acta veterinaria Hungaria. Vol. 44, No.1. p. 36-56.

Fonty, G. 1991. The rumen anaerobic fungi. En: Jouany J.P. Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. París: INRA. p. 53 – 70.

Forbes, J.M. ; France, J. 1993. Quantitative aspects of ruminal digestion and metabolism. Cambridge: University Press. p. 515.

Galindo, J.A. 1991. Identificación de *Bacilos celulíticos* Gram negativos aislados del rumen de vacas que consumen ensilaje de baja calidad. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. p. 32-35.

García, A.; Thiex, N.; Kalscheur, K.; Tjardes, K. 2005. Interpretación del análisis del ensilaje de maíz. College of Agriculture and Biological Sciences. South Dakota State University. p. 2.

Gohl, B. 1982. Piensos tropicales. Colección FAO: Producción y Sanidad Animal, No. 12. Roma: FAO.

González, V. 1996. Nutrición y biotecnología como herramienta para mejorar la producción y la eficiencia en las explotaciones lecheras. En: Avances en alimentación y mejora animal. Vol.36, No. 1. p. 3-10.

Guoqiang, D.; Kaul, R.; Mattiasson, B. 1991. Evaluation of alginate immobilized *Lactobacillus casei* for lactate production. Applied Microbiology Biotechnology 36. p. 309-314.

Guzmán, J.E. 1998. Pastos y forrajes de Venezuela. Segunda edición. Espasande, S.R.L. Caracas. p. 488.

Harrison, J.H.; Fransen, S. Silage management in North America. 1991. In: Bolsen, K.K.; Baylor, J.E.; McCullough, M.E. (Eds.). Field Guide for Hay and Silage Management in North America, National Feed Ingredients Association. p. 33–66.

ICA, Ganadería Bloque Modular. 1985. Manejo del silo: Cultivo de pastos y forrajes, Bogotá. p. 6-23.

Jones, K. 1998. Technology of formulation and application. In: Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. p. 197-210.

Jouany J.P. 1991. Defaunation of the rumen. En: Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. París: INRA. p. 239 – 261.

Karlen, D.L.; Camp, C.R.; Zublena J.P. 1985. Plant density, distribution and fertilizer effects on yield and quality of irrigated corn silage. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 16. p. 16-55.

Knowlton, K.E.; Pitt, R.E. y Fox, D.G. 1993. Model predicted value of enzymes treated alfalfa silage for lactating dairy cows. J. of Production Agriculture. Vol. 6, No. 12. p. 280-286.

Laredo, C.; Kleermann, G. 1990. Tabla nutricional para ganado de leche. Bogotá: ICA-GTZ.

Loaiza, M.C. 2000. Evaluación de la relación costo beneficio de la suplementación alimenticia con ensilaje de maíz en las épocas críticas en hacienda La Caña (Córdoba). Medellín. Universidad de Antioquia. Facultad de Veterinaria y Zootecnia. p. 9, 10, 14.

Luedeking, R. Piret, E. 2000. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 67. No. 6. p. 393 – 401.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, O. 2004. *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall. p. 151.

Masuko, T.; Okada, S.; Uchimira, T.; Awaya, K. 1992. Effects of inoculation with lactic acid bacterial culture al ensiling on the fermentative quality and flora of lactic acid bacteria of grass silage. *anim. –SCI. - Technol*. Vol. 63 No.11. p 1182-1187.

McAllister, T.A.; Feniuk, R.; Mir, Z.; Mir, P.; Selinger, L.B.; Cheng, K.J. 1998. Inoculants for alfalfa silage: Effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. *Livestock Production Science* 53. p. 171-181.

McDonald, P.; Henderson, A. R.; Heron, S.J.E. 1991. *The biochemistry of silage*. Bucks –uk chalcombe – publications. p. 340.

McIlroy, R.J. 1987. Introducción al cultivo de pastos tropicales. Limusa S.A. México. p.168.

Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagents for determination of reducing sugar. *Analysis Chemical* 31. p. 26, 31.

Montgomery, D. 2006. Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley. Segunda edición. p. 82.

Nicklas-Bray, S.A. 1998. Nuevos desarrollos en los ensilajes. *Revista Holstein*. Mayo 1998. p. 42-46.

Núñez, H. G.; Faz, R.; González, F.; Peña, A. 2005. Madurez de híbridos de maíz a la cosecha para mejorar la producción y calidad del forraje. *Téc. Pec. Méx.* 43(1) p. 69-78.

Oramas, C.; Vivas, N.J. 2007. Evaluación de dos híbridos y una variedad de maíz (*Zea mays*) en monocultivo y en asociación con frijol (*Phaseolus vulgaris*), para ensilaje. *Facultad de ciencias agropecuarias*. Vol. 5. No. 1. p. 33-34.

Pahlow, G.; Muck, R.E.; Driehuis, F.; Elferink, S.J.; Spolestra S. 2003. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R.E., Harrison, J.H. *Silage Science and Technology*. ASA Inc. In: Hassanat F.; Mustafa A.F.; Seguin P.

Effects of inoculation on ensiling characteristics, chemical composition and aerobic stability of regular and brown midrib millet silages. Madison, WI, USA, p. 31-93.

Pelczar, J.M. 1984. Elementos de microbiología. Mc Graw Hill, México. p. 253-283.

Pitt, R.E. 1993. Silage and Hay Preservation. Cornell University Cooperative Extension, Bulletin No. NRAES-5. p. 1–20.

Prescott, J.M.; Peters V.J.; Snell, E. 1953. Peptides and bacterial growth. IV. Histidine peptides as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii* 9649. J. Biol. Chem 202, p. 521: 532.

Prescott, H.K. 2002. Microbiología. Mc Graw Hill. Quinta edición. p. 49.

Sabogal, R.; Poveda, C.; Moncada, A. 1987. Alimentación de cerdos con ensilaje de contenido ruminal. Actualidades técnicas. ICA. Vol. 4. Bogotá – Colombia.

Sánchez, L.; De La Torre, L.F.; García, G. 2001. Ensilaje como alternativa sostenible para la producción bovina en las áreas del D.C. Corpoica (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). Santa Fé de Bogotá.

Soto, P.; Jahn, E.; Arredondo, S. 2002. Población y fertilización nitrogenada en un híbrido de maíz para ensilaje en el valle central regado. *Agric. Téc. (Chile)* 62. p. 255-265.

Staples, Ch.; Ruíz, T.; Bernal, E. 1993. Alimentación de ganadero lechero con ensilaje de pasto bermuda. Departamento de Producción Lechera. Universidad de Florida, Gainesville.

Stewart, C.S.; Bryant, M.P. 1988. The rumen bacteria. En: *The rumen microbial ecosystem*. Edited by P.N. Hobson. Elsevier applied science. p. 21-75.

Suárez, D. 2007. Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Departamento de Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT. p. 45-47.

Tamayo, C. 2007. ¿Qué produce el rumen?. *Despertar Lechero*. Edición No. 22. p. 58-71.

Van Soest, P.J. 1994. *Nutrition ecology of the ruminant*. Ithaca: Cornell University Press. Second edition. New York, p: 476.

Vargas, E.M.; Gómez, C.J.; Parra, M.E.; Romero, M.A. 2004. Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para

ganado vacuno (primera parte). Revista Facultad de Ingeniería. Universidad de los Andes. p. 167-176.

Yokohama, M.; Ka, J. 1993. Microbiología del rumen y del intestino. En: Fisiología digestiva y nutrición. Ed Church, D.C. Zaragoza: Acribia. p:138-156.

Woolford, M. 1998. La ciencia y tecnología del proceso de ensilaje. Oxford Biological Consultancy. United Kingdom. p. 3, 6, 7, 23.

Zapata, O. 1992. Conservación de forrajes en la alimentación animal. En: ICA – informa Colombia. p.15.

CIBERGRAFÍA

Bertoia L. 2004. Algunos conceptos sobre ensilaje. Facultad de ciencias agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora.
<http://mejorpasto.com.ar/UNLZ/2004/TX3.htm>

Consultado: Enero 17 de 2008.

Contreras, F.; Muck, R. 2006. Inoculantes microbiales para ensilaje. Focus on forage.
<http://www.uwex.edu/ces/crops/uwforage/Microbial%20Inoculants%20for%20Silage-Espanol.pdf>.

Consultado: Junio 13 de 2007.

Di Nucci, E.; Díaz, M.G.; Pasinato, A. 2004. Producción de forraje y calidad de silaje de híbridos de maíz. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
http://www.inta.gov.ar/parana/info/documentos/produccion_vegetal/forrajes/otros_documentos/20410_051202_prod.htm

Consultado: Enero 17 de 2007.

Grudsky, R.; Arias, J.L. 1983. Aspectos generales de la microbiología del rumen. Monografías de Medicina Veterinaria, 5(2). Facultas de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales. Universidad de Chile. [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo del alimento /12-microbiologia.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/12-microbiologia.pdf).

Consultado: Febrero 6 de 2008.

Nava, C.; Díaz, A. 2001. Introducción a la digestión ruminal. Departamento de Nutrición Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. <http://www.inta.gov.ar/ascasubi/info/boletin/hojas%20informativas%20electr%C3%B3nicas/HOJA%2047/EI%20rumen.doc>.

Consultado: Junio 13 de 2007.

Moreno, N. 2005. Legislación y normativa sobre comercialización y control de calidad de inoculantes para la agricultura en Colombia. Instituto de biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. p. 10. <http://www.biofag.org.ar/actividades/talleres/AbstractTaller2005.pdf>.

Consultado: Junio 26 de 2007.

Rivas, M.A.; García, A.; Pérez, J., Rodríguez, J.; López, J.F. 2006. Rendimiento, contenido proteico y fibras ácida y neutra de ensilado de maíz, cosechado en dos estados de madurez. www.engormix.com/rendimiento_contenido_proteico_fibras_s_articulos_967_AGR.htm

Consultado: Enero 6 de 2008

Uriarte, M.E. 2004. Ensilaje echado a perder: ¿Se puede evitar?. NUTRIX S.A. http://www.oznet.k-state.edu/pr_silage/publications/CIGAL%202004%20-%20Estela%20Uriarte%204-8-08.pdf

Consultado: Febrero 7 de 2008.

Trillos, G.L.; Plata, O.L.; Mestre, A.T.; Araujo, G.A. 2007. Análisis físico – químico de los contenidos ruminales frescos y ensilados de bovinos sacrificados en el Valle del César. Facultad de Ingenierías. Programa de Agroindustria. Universidad Popular del César. Valledupar, César.

http://www.engormix.com/analisis_fisico_quimicos_contenidos_s_articulos_954_G_DC.htm.

Consultado: Junio 8 de 2007

Wattiaux, M.; Howard, T. 2007. Digestión en la vaca lechera. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison. p. 1-4.
<http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/01.es.pdf>.

Consultado: Junio 4 de 2007.

Zuñiga, D. 2005. Legislación y normativa sobre comercialización y control de calidad de inoculantes para la agricultura en Perú. Departamento de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina. p. 14.
<http://www.biofag.org.ar/actividades/talleres/AbstractTaller2005.pdf>.

Consultado: Junio 26 de 2007.

ANEXO A

TINCIÓN DE GRAM

Esta Tinción sirve para diferenciar las bacterias Gram Positivas y las bacterias Gram negativas. Las bacterias Gram positivas mediante este método se tiñen de color azul violeta y las bacterias Gram Negativas se tiñen de color rojizo.

El procedimiento es el siguiente:

1. Se flamea el asa con que se va a sacar la muestra hasta que tome un color rojo y se deja enfriar.
2. Se toma una pequeña muestra de la bacteria a colorear y se extiende sobre una placa con una gota de agua destilada.
3. Se flamea nuevamente la placa, tomando la precaución de no dejarla calentar mucho, hasta que esté seca, así se asegura que las bacterias queden fijas a la placa.
4. Sobre un puente de coloración se siguen los siguientes pasos para la coloración.
 - ❖ Con la placa totalmente seca se agregan varias gotas de Cristal violeta hasta que el extendido quede cubierto totalmente y se deja reposar por un minuto.
 - ❖ Juagar la placa con agua, con la precaución de no exponer directamente el extendido.
 - ❖ Agregar varias gotas de Lugol con el fin de fijar el cristal violeta y dejar reposar por un minuto.
 - ❖ Enjuagar con agua.
 - ❖ Agregar Alcohol Acetona sobre la muestra y dejar reposar por 30 segundos.
 - ❖ Enjuagar con agua.
 - ❖ Agregar varias gotas de Safranina sobre la muestra y dejar reposar por un minuto.

- ❖ Lavar con agua.
- 5. Dejar secar la muestra, bien sea flameándola o esperando a que se seque sola.
- 6. Agregar aceite de inmersión para observar bajo el microscopio.
- 7. Enfocar en el microscopio con lente 10X

ANEXO B

DETERMINACION DE AZÚCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL DNS

Reactivos: Ácido Dinitrosalicílico al 1% (DNS), stock de glucosa de 0.4% (4 g/l)

Preparación De Reactivos:

- Preparación de la solución estándar (stock) de glucosa: tomar 0.400 gr. de glucosa anhidra grado reactivo con exactitud hasta la décima de mg, disolver, ajustar a aforo de 100 mL con agua desionizada, empacar en viales y almacenar en congelador para su posterior uso.
- Preparación del DNS: Pesar 1.6 gr. de hidróxido de sodio grado reactivo, 30 gr. de tartrato de sodio y potasio y disolverlos juntos con 50 mL de agua desionizada. Aparte pesar 1.0 gr. del DNS, disolver con 30 mL de agua desionizada. Agregar lentamente y con agitación la solución del DNS a la solución de tartrato y NaOH anteriormente preparadas. Ajustar a aforo de 100 mL, filtrar, envasar en frasco ámbar y rotular adecuadamente según la norma del laboratorio con fecha de vencimiento incluida (3 meses máximo), mantener a la temperatura del laboratorio.

Procedimiento

- Preparación de la curva:

Nº Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6
Glucosa stock (mL)	0.0	0.025	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150
H ₂ O destilada (mL)	0.500	0.475	0.450	0.425	0.400	0.375	0.350
gr./L de glucosa	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

Preparar en cada tubo (soluciones de curva patrón, las muestras problema diluida si es necesario y agua como blanco) 0.5 ml de solución en total.

- Adicionar 0.5 ml del reactivo del DNS a cada tubo.
- Agitar todos los tubos en Vortex.
- Llevar a ebullición por 5 minutos en baño María.
- Enfriar hasta temperatura ambiente.
- Adicionar a cada tubo 5 ml de agua destilada y agitar en Vortex.
- Dejar en reposo 15 min. y leer a 540 nm.
- Realizar la curva absorbancia vs. concentración.

ANEXO C

CUADRO DE OLORES Y COLORES

VALOR NUMÉRICO	VALOR CUALITATIVO	OLOR	COLOR
1	Excelente	Agradable con olor a miel	Marrón oscuro
2	Bueno	Agradable con ligero olor a miel	Marrón oscuro
3	Regular	Fuerte con ligero olor a vinagre	Café oscuro
4	Malo	Desagradable con ligero olor a estiércol	Café con partes negras
5	Pésimo	Desagradable con olor fuerte a estiércol	Negro

ANEXO D

RESULTADOS DE LA FERMENTACIÓN

Cinética de la fermentación con una concentración de 15 gr./L de carbonato de calcio en el shaker.

Tiempo (h)	Concentración de biomasa (g/L)	Error
0	1,375	0,075
3	1,415	0,025
8	1,555	0,075
11	1,960	0,160
13	2,620	0,140
15	3,155	0,105
25	3,615	0,025
27	3,535	0,015
29	3,520	0,040
32	3,125	0,145

Consumo de sustrato de *L. casei*.

Tiempo (h)	Concentración de glucosa (g/L)	Error
0	25,80	0,70
3	24,45	0,25
8	22,70	0,60
11	20,95	0,45
13	16,85	1,05
15	15,00	0,10
25	9,80	0,60
27	4,10	0,20
29	3,75	0,05
32	3,60	0,10

ANEXO E

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA *Lactobacillus casei*

Primer ensilaje Análisis unifactorial

Prueba	pH	Color	Olor	% Materia Seca	% Humedad	% Proteína	% Cenizas	% FDA	% FDN
Bartlett	0.39	0.99	0.99	0.97	0.97	0.053	0.66	0.31	0.19
Skewness	0.80	0.27	0.27	-1.01	1.01	1.39	-1.42	0.14	0.21
Kurtosis	-0.78	0.15	0.15	0.45	-0.45	1.39	0.31	-0.38	-0.81

ANOVA Table for COLOR by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10.5833	4	2.64583	7.94	0.0097
Within groups	2.33333	7	0.333333		
Total (Corr.)	12.9167	11			

Multiple Range Tests for COLOR by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
E	2	1.5	X
C	3	2.33333	XX
O	2	3.0	X
W	3	3.33333	XX
S	2	4.5	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - E	0.833333	1.24627
C - O	-0.666667	1.24627
C - S	*-2.16667	1.24627
C - W	-1.0	1.1147
E - O	*-1.5	1.36522
E - S	*-3.0	1.36522
E - W	*-1.83333	1.24627
O - S	*-1.5	1.36522
O - W	-0.333333	1.24627
S - W	1.16667	1.24627

 * denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for OLOR by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10.5833	4	2.64583	7.94	0.0097
Within groups	2.33333	7	0.333333		
Total (Corr.)	12.9167	11			

Multiple Range Tests for OLOR by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
E	2	1.5	X
C	3	2.33333	XX
O	2	3.0	X
W	3	3.33333	XX
S	2	4.5	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - E	0.833333	1.24627
C - O	-0.666667	1.24627
C - S	*-2.16667	1.24627
C - W	-1.0	1.1147
E - O	*-1.5	1.36522
E - S	*-3.0	1.36522
E - W	*-1.83333	1.24627
O - S	*-1.5	1.36522
O - W	-0.333333	1.24627
S - W	1.16667	1.24627

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for pH by FORMULACION

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.18518	4	0.296294	24.91	0.0003
Within groups	0.08325	7	0.0118929		
Total (Corr.)	1.26843	11			

Multiple Range Tests for pH by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
E	2	4.11	X
C	3	4.29	X
O	2	4.34	X
W	3	4.75	X
S	2	5.005	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - E	0.18	0.235405
C - O	-0.05	0.235405
C - S	*-0.715	0.235405
C - W	*-0.46	0.210553
E - O	-0.23	0.257873
E - S	*-0.895	0.257873
E - W	*-0.64	0.235405
O - S	*-0.665	0.257873
O - W	*-0.41	0.235405
S - W	*0.255	0.235405

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for %MATERIA SECA by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	295.566	4	73.8916	193.52	0.0000
Within groups	1.90915	5	0.38183		
Total (Corr.)	297.475	9			

Multiple Range Tests for %MATERIA SECA by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
S	2	15.86	X
W	2	22.495	X
O	2	27.625	X
E	2	28.49	X
C	2	31.245	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - E	*2.755	1.58843
C - O	*3.62	1.58843
C - S	*15.385	1.58843
C - W	*8.75	1.58843
E - O	0.865	1.58843
E - S	*12.63	1.58843
E - W	*5.995	1.58843
O - S	*11.765	1.58843
O - W	*5.13	1.58843
S - W	*-6.635	1.58843

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for %HUMEDAD by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	295.566	4	73.8916	193.52	0.0000
Within groups	1.90915	5	0.38183		
Total (Corr.)	297.475	9			

Multiple Range Tests for %HUMEDAD by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
C	2	68.755	X
E	2	71.51	X
O	2	72.375	X
W	2	77.505	X
S	2	84.14	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - E	*-2.755	1.58843
C - O	*-3.62	1.58843
C - S	*-15.385	1.58843
C - W	*-8.75	1.58843
E - O	-0.865	1.58843
E - S	*-12.63	1.58843
E - W	*-5.995	1.58843
O - S	*-11.765	1.58843
O - W	*-5.13	1.58843
S - W	*6.635	1.58843

 * denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for %CENIZA by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.4199	4	0.604975	11.40	0.0100
Within groups	0.26535	5	0.05307		
Total (Corr.)	2.68525	9			

Multiple Range Tests for %CENIZA by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
S	2	2.26	X
O	2	3.345	X
C	2	3.395	X
W	2	3.395	X
E	2	3.68	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - E	-0.285	0.592185
C - O	0.05	0.592185
C - S	*1.135	0.592185
C - W	0.0	0.592185
E - O	0.335	0.592185
E - S	*1.42	0.592185
E - W	0.285	0.592185
O - S	*1.085	0.592185
O - W	-0.05	0.592185
S - W	*-1.135	0.592185

 * denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for %PROTEINA by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10.4375	4	2.60938	5.85	0.0398
Within groups	2.2299	5	0.44598		
Total (Corr.)	12.6674	9			

Multiple Range Tests for %PROTEINA by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
S	2	1.53	X
O	2	2.46	XX
C	2	2.795	XX
E	2	3.415	XX
W	2	4.6	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - E	-0.62	1.71668
C - O	0.335	1.71668
C - S	1.265	1.71668
C - W	*-1.805	1.71668
E - O	0.955	1.71668
E - S	*1.885	1.71668
E - W	-1.185	1.71668
O - S	0.93	1.71668
O - W	*-2.14	1.71668
S - W	*-3.07	1.71668

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for % FDA by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.81236	4	0.70309	9.36	0.0153
Within groups	0.3754	5	0.07508		
Total (Corr.)	3.18776	9			

Multiple Range Tests for % FDA by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
W	2	8.205	X
S	2	8.71	XX
C	2	8.915	X
E	2	9.315	XX
O	2	9.765	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - E	-0.4	0.70436
C - O	*-0.85	0.70436
C - S	0.205	0.70436
C - W	*0.71	0.70436
E - O	-0.45	0.70436
E - S	0.605	0.70436
E - W	*1.11	0.70436
O - S	*1.055	0.70436
O - W	*1.56	0.70436
S - W	0.505	0.70436

 * denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for % FDN by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	27.1497	4	6.78742	19.80	0.0029
Within groups	1.71375	5	0.34275		
Total (Corr.)	28.8634	9			

Multiple Range Tests for % FDN by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
S	2	11.55	X
W	2	11.93	X
E	2	13.825	X
C	2	14.325	X
O	2	16.055	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - E	0.5	1.50495
C - O	*-1.73	1.50495
C - S	*2.775	1.50495
C - W	*2.395	1.50495
E - O	*-2.23	1.50495
E - S	*2.275	1.50495
E - W	*1.895	1.50495
O - S	*4.505	1.50495
O - W	*4.125	1.50495
S - W	-0.38	1.50495

 * denotes a statistically significant difference.

ANEXO F

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA *Lactobacillus casei*

Segundo ensilaje multifactorial

Analysis of Variance for pH - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:FORMULACION	0.00160556	1	0.00160556	0.07	0.7948
B:DOSIFICACION	0.155478	2	0.0777389	3.42	0.0666
INTERACTIONS					
AB	0.131344	2	0.0656722	2.89	0.0944
RESIDUAL	0.272533	12	0.0227111		
TOTAL (CORRECTED)	0.560961	17			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for pH by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
E	9	4.65333	0.050234	X
S	9	4.67222	0.050234	X

Contrast	Difference	+/- Limits
E - S	-0.0188889	0.154787

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for pH by DOSIFICACION

Method: 95.0 percent LSD

DOSIFICACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I1	6	4.535	0.0615239	X
I3	6	4.7	0.0615239	XX
I2	6	4.75333	0.0615239	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I1 - I2	*-0.218333	0.189574
I1 - I3	-0.165	0.189574
I2 - I3	0.0533333	0.189574

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for COLOR - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:FORMULACION	4.5	1	4.5	16.20	0.0017
B:DOSIFICACION	1.44444	2	0.722222	2.60	0.1153
INTERACTIONS					
AB	0.333333	2	0.166667	0.60	0.5645
RESIDUAL	3.33333	12	0.277778		
TOTAL (CORRECTED)	9.61111	17			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for COLOR by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
E	9	1.77778	0.170589	X
S	9	2.77778	0.170589	X

Contrast	Difference	+/- Limits
E - S	*-1.0	0.517429

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for COLOR by DOSIFICACION

Method: 95.0 percent LSD

DOSIFICACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I1	6	2.0	0.208928	X
I2	6	2.16667	0.208928	XX
I3	6	2.66667	0.208928	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I1 - I2	-0.166667	0.633718
I1 - I3	*-0.666667	0.633718
I2 - I3	-0.5	0.633718

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for OLOR - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:FORMULACION	4.5	1	4.5	16.20	0.0017
B:DOSIFICACION	1.44444	2	0.722222	2.60	0.1153
INTERACTIONS					
AB	0.333333	2	0.166667	0.60	0.5645
RESIDUAL	3.33333	12	0.277778		
TOTAL (CORRECTED)	9.61111	17			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for OLOR by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
E	9	1.77778	0.175682	X
S	9	2.77778	0.175682	X

Contrast	Difference	+/- Limits
E - S	*-1.0	0.541332

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for OLOR by DOSIFICACION

Method: 95.0 percent LSD

DOSIFICACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I1	6	2.0	0.215166	X
I2	6	2.16667	0.215166	XX
I3	6	2.66667	0.215166	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I1 - I2	-0.166667	0.662993
I1 - I3	*-0.666667	0.662993
I2 - I3	-0.5	0.662993

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for % PROTEINA - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:FORMULACION	0.009075	1	0.009075	0.34	0.5804
B:DOSIFICACION	1.46662	2	0.733308	27.58	0.0009
INTERACTIONS					
AB	4.36505	2	2.18252	82.08	0.0000
RESIDUAL	0.15955	6	0.0265917		
TOTAL (CORRECTED)	6.00029	11			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for % PROTEINA by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
E	6	2.91333	0.0665729	X
S	6	2.96833	0.0665729	X

Contrast	Difference	+/- Limits
E - S	-0.055	0.230373

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for % PROTEINA by DOSIFICACION

Method: 95.0 percent LSD

DOSIFICACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I1	4	2,465	0,0815348	X
I2	4	3,0625	0,0815348	X
I3	4	3,295	0,0815348	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I1 - I2	*-0,5975	0,282148
I1 - I3	*-0,83	0,282148
I2 - I3	-0,2325	0,282148

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for %MATERIA SECA - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:FORMULACION	9.9372	1	9.9372	3.66	0.1044
B:DOSIFICACION	11.715	2	5.85751	2.16	0.1970
INTERACTIONS					
AB	2.52855	2	1.26428	0.47	0.6489
RESIDUAL	16.3046	6	2.71743		
TOTAL (CORRECTED)	40.4854	11			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for %MATERIA SECA by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
S	6	19.0217	0.672983	X
E	6	20.8417	0.672983	X

Contrast	Difference	+/- Limits
E - S	1.82	2.32883

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for %MATERIA SECA by DOSIFICACION

Method: 95.0 percent LSD

DOSIFICACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I2	4	18.5375	0.767161	X
I1	4	20.5475	0.767161	X
I3	4	20.71	0.767161	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I1 - I2	2.01	2.50186
I1 - I3	-0.1625	2.50186
I2 - I3	-2.1725	2.50186

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for % HUMEDAD - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:DOSIFICACION	11.715	2	5.85751	2.16	0.1970
B:FORMULACION	9.9372	1	9.9372	3.66	0.1044
INTERACTIONS					
AB	2.52855	2	1.26428	0.47	0.6489
RESIDUAL	16.3046	6	2.71743		
TOTAL (CORRECTED)	40.4854	11			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for % HUMEDAD by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
E	6	79.1583	0.626384	X
S	6	80.9783	0.626384	X

Contrast	Difference	+/- Limits
E - S	-1.82	2.04276

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for % HUMEDAD by DOSIFICACION

Method: 95.0 percent LSD

DOSIFICACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I3	4	79.29	0.824232	X
I1	4	79.4525	0.824232	X
I2	4	81.4625	0.824232	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I1 - I2	-2.01	2.85223
I1 - I3	0.1625	2.85223
I2 - I3	2.1725	2.85223

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for % CENIZAS - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:DOSIFICACION	0.658217	2	0.329108	5.03	0.0521
B:FORMULACION	0.0161333	1	0.0161333	0.25	0.6370
INTERACTIONS					
AB	0.138017	2	0.0690083	1.06	0.4048
RESIDUAL	0.3923	6	0.0653833		
TOTAL (CORRECTED)	1.20467	11			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for % CENIZAS by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
S	6	2.98	0.105111	X
E	6	3.05333	0.105111	X

Contrast	Difference	+/- Limits
E - S	0.0733333	0.342786

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for % CENIZAS by DOSIFICACION

Method: 95.0 percent LSD

DOSIFICACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I2	4	2.785	0.127851	X
I3	4	2.9275	0.127851	XX
I1	4	3.3375	0.127851	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I1 - I2	*0.5525	0.442423
I1 - I3	0.41	0.442423
I2 - I3	-0.1425	0.442423

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for % FDA - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:FORMULACION	3.21368	1	3.21368	86.64	0.0001
B:DOSIFICACION	0.439317	2	0.219658	5.92	0.0380
INTERACTIONS					
AB	0.64415	2	0.322075	8.68	0.0169
RESIDUAL	0.22255	6	0.0370917		
TOTAL (CORRECTED)	4.51969	11			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for % FDA by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
S	6	6.91833	0.0786253	X
E	6	7.95333	0.0786253	X

Contrast	Difference	+/- Limits
E - S	*1.035	0.27208

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for % FDA by DOSIFICACION

Method: 95.0 percent LSD

DOSIFICACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I2	4	7.17	0.164573	X
I1	4	7.525	0.164573	X
I3	4	7.6125	0.164573	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I1 - I2	0.355	0.536705
I1 - I3	-0.0875	0.536705
I2 - I3	-0.4425	0.536705

* denotes a statistically significant difference.

Analysis of Variance for % FDN - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:DOSIFICACION	5.2862	2	2.6431	25.12	0.0012
B:FORMULACION	2.1168	1	2.1168	20.12	0.0042
INTERACTIONS					
AB	0.4214	2	0.2107	2.00	0.2156
RESIDUAL	0.6312	6	0.1052		
TOTAL (CORRECTED)	8.4556	11			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Multiple Range Tests for % FDN by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
S	6	10.7	0.132413	X
E	6	11.54	0.132413	X

Contrast	Difference	+/- Limits
E - S	*0.84	0.458212

* denotes a statistically significant difference.

Multiple Range Tests for % FDN by DOSIFICACION

Method: 95.0 percent LSD

DOSIFICACION	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I2	4	10.545	0.162173	X
I1	4	10.765	0.162173	X
I3	4	12.05	0.162173	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I1 - I2	0.22	0.561193
I1 - I3	*-1.285	0.561193
I2 - I3	*-1.505	0.561193

* denotes a statistically significant difference.

ANEXO G

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA *Lactobacillus casei*

Segundo ensilaje Análisis unifactorial

Prueba	pH	Color	Olor	% Materia Seca	% Humedad	% Proteína	% Cenizas	% FDA	% FDN
Bartlett	0.410	1	1	0.98	0.984	0.578	0.890	0.407	0.674
Skewness	-0.479	0.413	0.413	-0.11	0.113	-0.760	-0.762	-1.790	-0.477
Kurtosis	-0.493	0.173	0.173	-0.21	-0.213	0.624	-0.413	0.695	0.384

ANOVA Table for COLOR by FORMULACION

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6.66667	6	1.11111	3.89	0.0170
Within groups	4.0	14	0.285714		
Total (Corr.)	10.6667	20			

Multiple Range Tests for COLOR by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
EI1	3	1.66667	X
EI2	3	1.66667	X
EI3	3	2.0	XX
SI1	3	2.33333	XX
SI2	3	2.66667	XX
C	3	2.66667	XX
SI3	3	3.33333	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - EI1	*1.0	0.936064
C - EI2	*1.0	0.936064
C - EI3	0.666667	0.936064
C - SI1	0.333333	0.936064
C - SI2	0.0	0.936064
C - SI3	-0.666667	0.936064
EI1 - EI2	0.0	0.936064
EI1 - EI3	-0.333333	0.936064
EI1 - SI1	-0.666667	0.936064
EI1 - SI2	*-1.0	0.936064
EI1 - SI3	*-1.66667	0.936064
EI2 - EI3	-0.333333	0.936064
EI2 - SI1	-0.666667	0.936064
EI2 - SI2	*-1.0	0.936064
EI2 - SI3	*-1.66667	0.936064
EI3 - SI1	-0.333333	0.936064
EI3 - SI2	-0.666667	0.936064
EI3 - SI3	*-1.33333	0.936064
SI1 - SI2	-0.333333	0.936064
SI1 - SI3	*-1.0	0.936064
SI2 - SI3	-0.666667	0.936064

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for OLOR by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6.66667	6	1.11111	3.89	0.0170
Within groups	4.0	14	0.285714		
Total (Corr.)	10.6667	20			

Multiple Range Tests for OLOR by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
EI1	3	1.66667	X
EI2	3	1.66667	X
EI3	3	2.0	XX
SI1	3	2.33333	XX
SI2	3	2.66667	XX
C	3	2.66667	XX
SI3	3	3.33333	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - EI1	*1.0	0.936064
C - EI2	*1.0	0.936064
C - EI3	0.666667	0.936064
C - SI1	0.333333	0.936064
C - SI2	0.0	0.936064
C - SI3	-0.666667	0.936064
EI1 - EI2	0.0	0.936064
EI1 - EI3	-0.333333	0.936064
EI1 - SI1	-0.666667	0.936064
EI1 - SI2	*-1.0	0.936064
EI1 - SI3	*-1.66667	0.936064
EI2 - EI3	-0.333333	0.936064
EI2 - SI1	-0.666667	0.936064
EI2 - SI2	*-1.0	0.936064
EI2 - SI3	*-1.66667	0.936064
EI3 - SI1	-0.333333	0.936064
EI3 - SI2	-0.666667	0.936064
EI3 - SI3	*-1.33333	0.936064
SI1 - SI2	-0.333333	0.936064
SI1 - SI3	*-1.0	0.936064
SI2 - SI3	-0.666667	0.936064

 * denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for pH by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.290333	6	0.0483889	2.21	0.1038
Within groups	0.306333	14	0.021881		
Total (Corr.)	0.596667	20			

Multiple Range Tests for pH by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
EI1	3	4.50667	X
SI1	3	4.56333	XX
SI3	3	4.59667	XX
EI2	3	4.65	XXX
C	3	4.69	XXX
EI3	3	4.80333	XX
SI2	3	4.85667	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - EI1	0.183333	0.259043
C - EI2	0.04	0.259043
C - EI3	-0.113333	0.259043
C - SI1	0.126667	0.259043
C - SI2	-0.166667	0.259043
C - SI3	0.0933333	0.259043
EI1 - EI2	-0.143333	0.259043
EI1 - EI3	*-0.296667	0.259043
EI1 - SI1	-0.0566667	0.259043
EI1 - SI2	*-0.35	0.259043
EI1 - SI3	-0.09	0.259043
EI2 - EI3	-0.153333	0.259043
EI2 - SI1	0.0866667	0.259043
EI2 - SI2	-0.206667	0.259043
EI2 - SI3	0.0533333	0.259043
EI3 - SI1	0.24	0.259043
EI3 - SI2	-0.0533333	0.259043
EI3 - SI3	0.206667	0.259043
SI1 - SI2	*-0.293333	0.259043
SI1 - SI3	-0.0333333	0.259043
SI2 - SI3	*0.26	0.259043

 * denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for % PROTEINA by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5.88149	6	0.980248	42.67	0.0000
Within groups	0.1608	7	0.0229714		
Total (Corr.)	6.04229	13			

Multiple Range Tests for % PROTEINA by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
EI1	2	1.585	X
SI2	2	2.64	X
SI3	2	2.92	XX
C	2	3.095	XX
SI1	2	3.345	XX
EI2	2	3.485	X
EI3	2	3.67	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - EI1	*1.51	0.358391
C - EI2	*-0.39	0.358391
C - EI3	*-0.575	0.358391
C - SI1	-0.25	0.358391
C - SI2	*0.455	0.358391
C - SI3	0.175	0.358391
EI1 - EI2	*-1.9	0.358391
EI1 - EI3	*-2.085	0.358391
EI1 - SI1	*-1.76	0.358391
EI1 - SI2	*-1.055	0.358391
EI1 - SI3	*-1.335	0.358391
EI2 - EI3	-0.185	0.358391
EI2 - SI1	0.14	0.358391
EI2 - SI2	*0.845	0.358391
EI2 - SI3	*0.565	0.358391
EI3 - SI1	0.325	0.358391
EI3 - SI2	*1.03	0.358391
EI3 - SI3	*0.75	0.358391
SI1 - SI2	*0.705	0.358391
SI1 - SI3	*0.425	0.358391
SI2 - SI3	-0.28	0.358391

 * denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for %MATERIA SECA by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	38.2356	6	6.37261	2.58	0.1205
Within groups	17.2987	7	2.47124		
Total (Corr.)	55.5343	13			

Multiple Range Tests for %MATERIA SECA by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
SI2	2	18.115	X
EI2	2	18.96	XX
SI3	2	19.185	XXX
SI1	2	19.765	XXX
EI1	2	21.33	XXX
EI3	2	22.235	XX
C	2	22.795	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - EI1	1.465	3.71724
C - EI2	*3.835	3.71724
C - EI3	0.56	3.71724
C - SI1	3.03	3.71724
C - SI2	*4.68	3.71724
C - SI3	3.61	3.71724
EI1 - EI2	2.37	3.71724
EI1 - EI3	-0.905	3.71724
EI1 - SI1	1.565	3.71724
EI1 - SI2	3.215	3.71724
EI1 - SI3	2.145	3.71724
EI2 - EI3	-3.275	3.71724
EI2 - SI1	-0.805	3.71724
EI2 - SI2	0.845	3.71724
EI2 - SI3	-0.225	3.71724
EI3 - SI1	2.47	3.71724
EI3 - SI2	*4.12	3.71724
EI3 - SI3	3.05	3.71724
SI1 - SI2	1.65	3.71724
SI1 - SI3	0.58	3.71724
SI2 - SI3	-1.07	3.71724

 * denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for % HUMEDAD by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	38.2356	6	6.37261	2.58	0.1205
Within groups	17.2986	7	2.47124		
Total (Corr.)	55.5343	13			

Multiple Range Tests for % HUMEDAD by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
C	2	77.205	X
EI3	2	77.765	XX
EI1	2	78.67	XXX
SI1	2	80.235	XXX
SI3	2	80.815	XXX
EI2	2	81.04	XX
SI2	2	81.885	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - EI1	-1.465	3.71724
C - EI2	*-3.835	3.71724
C - EI3	-0.56	3.71724
C - SI1	-3.03	3.71724
C - SI2	*-4.68	3.71724
C - SI3	-3.61	3.71724
EI1 - EI2	-2.37	3.71724
EI1 - EI3	0.905	3.71724
EI1 - SI1	-1.565	3.71724
EI1 - SI2	-3.215	3.71724
EI1 - SI3	-2.145	3.71724
EI2 - EI3	3.275	3.71724
EI2 - SI1	0.805	3.71724
EI2 - SI2	-0.845	3.71724
EI2 - SI3	0.225	3.71724
EI3 - SI1	-2.47	3.71724
EI3 - SI2	*-4.12	3.71724
EI3 - SI3	-3.05	3.71724
SI1 - SI2	-1.65	3.71724
SI1 - SI3	-0.58	3.71724
SI2 - SI3	1.07	3.71724

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for % CENIZAS by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.909743	6	0.151624	2.66	0.1129
Within groups	0.39835	7	0.0569071		
Total (Corr.)	1.30809	13			

Multiple Range Tests for % CENIZAS by FORMULACION

Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
SI3	2	2.74	X
EI2	2	2.76	X
SI2	2	2.81	X
EI3	2	3.115	XX
C	2	3.255	XX
EI1	2	3.285	XX
SI1	2	3.39	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - EI1	-0.03	0.564088
C - EI2	0.495	0.564088
C - EI3	0.14	0.564088
C - SI1	-0.135	0.564088
C - SI2	0.445	0.564088
C - SI3	0.515	0.564088
EI1 - EI2	0.525	0.564088
EI1 - EI3	0.17	0.564088
EI1 - SI1	-0.105	0.564088
EI1 - SI2	0.475	0.564088
EI1 - SI3	0.545	0.564088
EI2 - EI3	-0.355	0.564088
EI2 - SI1	*-0.63	0.564088
EI2 - SI2	-0.05	0.564088
EI2 - SI3	0.02	0.564088
EI3 - SI1	-0.275	0.564088
EI3 - SI2	0.305	0.564088
EI3 - SI3	0.375	0.564088
SI1 - SI2	*0.58	0.564088
SI1 - SI3	*0.65	0.564088
SI2 - SI3	0.07	0.564088

* denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for % FDA by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4.426	6	0.737667	16.62	0.0008
Within groups	0.31075	7	0.0443929		
Total (Corr.)	4.73675	13			

Multiple Range Tests for % FDA by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
SI2	2	6.325	X
SI1	2	7.18	X
SI3	2	7.25	XX
C	2	7.71	XX
EI1	2	7.87	X
EI3	2	7.975	X
EI2	2	8.015	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - EI1	-0.16	0.498218
C - EI2	-0.305	0.498218
C - EI3	-0.265	0.498218
C - SI1	*0.53	0.498218
C - SI2	*1.385	0.498218
C - SI3	0.46	0.498218
EI1 - EI2	-0.145	0.498218
EI1 - EI3	-0.105	0.498218
EI1 - SI1	*0.69	0.498218
EI1 - SI2	*1.545	0.498218
EI1 - SI3	*0.62	0.498218
EI2 - EI3	0.04	0.498218
EI2 - SI1	*0.835	0.498218
EI2 - SI2	*1.69	0.498218
EI2 - SI3	*0.765	0.498218
EI3 - SI1	*0.795	0.498218
EI3 - SI2	*1.65	0.498218
EI3 - SI3	*0.725	0.498218
SI1 - SI2	*0.855	0.498218
SI1 - SI3	-0.07	0.498218
SI2 - SI3	*-0.925	0.498218

 * denotes a statistically significant difference.

ANOVA Table for % FDN by FORMULACION

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	9.1369	6	1.52282	16.78	0.0008
Within groups	0.63525	7	0.09075		
Total (Corr.)	9.77215	13			

Multiple Range Tests for % FDN by FORMULACION

 Method: 95.0 percent LSD

FORMULACION	Count	Mean	Homogeneous Groups
SI2	2	9.99	X
SI1	2	10.215	X
EI2	2	11.1	X
EI1	2	11.315	XX
SI3	2	11.895	XX
C	2	11.995	XX
EI3	2	12.205	X

Contrast	Difference	+/- Limits
C - EI1	0.68	0.712339
C - EI2	*0.895	0.712339
C - EI3	-0.21	0.712339
C - SI1	*1.78	0.712339
C - SI2	*2.005	0.712339
C - SI3	0.1	0.712339
EI1 - EI2	0.215	0.712339
EI1 - EI3	*-0.89	0.712339
EI1 - SI1	*1.1	0.712339
EI1 - SI2	*1.325	0.712339
EI1 - SI3	-0.58	0.712339
EI2 - EI3	*-1.105	0.712339
EI2 - SI1	*0.885	0.712339
EI2 - SI2	*1.11	0.712339
EI2 - SI3	*-0.795	0.712339
EI3 - SI1	*1.99	0.712339
EI3 - SI2	*2.215	0.712339
EI3 - SI3	0.31	0.712339
SI1 - SI2	0.225	0.712339
SI1 - SI3	*-1.68	0.712339
SI2 - SI3	*-1.905	0.712339

 * denotes a statistically significant difference.