



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO  
CÁTEDRA COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN  
“Dr. José Rafael Luna”  
UNIDAD CURRICULAR TRABAJO DE GRADO II**



***Lactobacillus* spp. Y COMUNIDADES MICROBIANAS ASOCIADAS AL  
PROCESO DE ENSILAJE EN SILOS A PARTIR DE *Ranunculus acris*  
(BOTÓN DE ORO)**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Autora:**

Prieto Quintero, María Antonieta

CI: 25.151.637

**Tutor:**

Prof. José Manuel Jiménez

Mérida, julio de 2023



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO  
CÁTEDRA COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN  
"Dr. José Rafael Luna"  
UNIDAD CURRICULAR TRABAJO DE GRADO II**



***Lactobacillus* spp. Y COMUNIDADES MICROBIANAS ASOCIADAS AL  
PROCESO DE ENSILAJE EN SILOS A PARTIR DE *Ranunculus acris* (Botón  
de oro)**

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Bioanálisis

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Autora:**

Prieto Quintero, María Antonieta

CI: 25.151.637

**Tutor:**

Prof. José Manuel Jiménez

Mérida, julio de 2023

## DEDICATORIA

A las generaciones futuras, que sirva como vivo ejemplo de perseverancia y resiliencia este manuscrito fruto de la divina voluntad del Padre Eterno y de mi esfuerzo, sea puesto al servicio para quienes necesiten referenciarlo y sirva de motivación para los que aún están en el camino tratando de alcanzar nuestro fin común, la Licenciatura en Bioanálisis.

A mi hermano menor Víctor Manuel y a mis apreciados sobrinos, son ustedes el porvenir de la sociedad venezolana y ante la actual crisis global, recae sobre nosotros los jóvenes el compromiso de marcar la diferencia; que esta obra sea de inspiración para ustedes con el propósito de buscar siempre la excelencia, de mantener la firme convicción de creer en el cambio hacia la integridad del ser humano, sin dejar de lado la espiritualidad, la fe y el servicio, sean estos la principal motivación para continuar esforzándonos y para seguir profundizando en las nuevas tecnologías útiles para el bien común.

A las ciencias de la salud y sus profesionales, en especial para aquellos que están de la mano con los pacientes, a manera de reflexión y haciendo un llamado a la actualización sobre el gran océano representado por los microbiomas y como el uso inapropiado de los antimicrobianos afecta esta pequeña gran población, la cual anteriormente parecía insignificante y falta de funcionalidad, pero que hoy en día se ha logrado vislumbrar su esencial importancia en el estado de salud del individuo, redireccionando los futuros tratamientos hacia un nuevo concepto llamado holobionte humano.

A la memoria de mi padre Antonio Argenis Prieto, quien hoy ya reposa esperando la venida del Mesías, gran fuente de inspiración, excelencia, esfuerzo y servicio humanitario; cito sus palabras para mantenerlas vivas como una certeza de pensamiento y obra "Soy feliz al ver mi pueblo feliz", más yo he comprendido que "Soy feliz cuando sirvo a mi pueblo en el justo propósito de Cristo Jesús".

María Antonieta Prieto Quintero

## AGRADECIMIENTOS

La gratitud, un gran don impartido por la fuente inagotable y principio de toda moralidad YAHWÉH Dios, para Él es todo el crédito, todo el honor; agradecida por derramar sobre este siervo inútil una gran copa de paciencia y sabiduría, sea siempre exaltado su nombre por medio de Nuestro Señor Jesucristo.

A mi familia, Madre, padrastro, hermanas, abuela, tíos (as), primos (as) y sobrinos (as) por todas sus oraciones y buena fe puesta en Dios Padre, a manera de intervención para que me fueran concedidas las capacidades necesarias en la elaboración de esta investigación, su amor y apoyo ha sido también mi motivación.

A mis hermanos en Cristo Jesús, fieles en oración y apoyándome con toda su sabiduría, les sea recompensado.

A la familia Jiménez Salas y el laboratorio Probiovital C.A., por facilitarme sus instalaciones y todo lo necesario para llevar a cabo la fase experimental de esta investigación, por abrir las puertas de su casa, ofrecerme su amistad y tutoría.

A la familia Saavedra Armas, Jáuregui y Dávila, por sus oportunos servicios, atenciones y amistad. Sé que Dios Padre ha obrado por medio de ustedes, gracias por el amor con el que me han recibido en sus hogares, les sea multiplicado.

A mis preciadas amistades de la vida universitaria, compañeros de trabajo en las más fascinantes jornadas, con el equipo 4 del laboratorio de emergencia del I.A.H.U.LA, a los facilitadores de cada unidad curricular, en particular al Licenciado Alexander Moreno. Todos bajo la misma alma de nuestra ilustre Universidad de los Andes hacemos vida, muchísimas gracias, Dios envíe sobre ustedes la satisfacción por contribuir con la formación académica de muchos.

A quienes desde afuera familiares y amigos que tras la diáspora perseveran y nos apoyan moral y económicamente, sean así mismo provistos de lo necesario allá en donde se encuentren, en la distancia; sea la voluntad del Padre en algún momento volverlos a ver.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>VEREDICTO</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>TABLA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>TABLA DE GRÁFICOS</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Antecedentes del problema.....	1
El Problema.....	6
Antecedentes Teóricos.....	6
Trabajos Previos.....	6
Antecedentes Históricos o Epistemológicos del Género <i>Lactobacillus</i> y las Comunidades Microbianas.....	9
Bases Teóricas.....	11
Aproximación Teórica sobre el Metabolismo Bacteriano. ....	11
Aproximación Teórica sobre la Microbiota en <i>R. acris</i> .....	12
Aproximación Teórica sobre los Cambios en las Comunidades Microbianas en Relación con el Tiempo de Ensilaje.....	12
Biotecnología Microbiana.....	13
Efecto Probiótico.....	13
Bacterias Ácido-lácticas (BAL).....	14
Clasificación de las BAL.....	14
Importancia de las BAL en la Industria .....	15
Unidad taxonómica de los Probióticos .....	15
Clasificación del Género <i>Lactobacillus</i> .....	16
Hábitat de lactobacilos.....	17

Medios de Cultivo para el Aislamiento de BAL.....	18
Características Microscópicas de las Células Bacterianas del género <i>Lactobacillus</i> .....	18
Curva de Crecimiento Bacteriano .....	19
Capacidad Antagonista de Los Lactobacilos.....	20
Ácidos Grasos Volátiles.....	20
Características Generales de <i>R. acris</i> (Botón de oro).....	20
Silos.....	22
Elaboración de Silajes a partir de <i>R. acris</i> .....	22
Ensilaje.....	22
El Proceso de Ensilaje.....	23
Microorganismos Indeseables en los Procesos de Ensilaje.....	24
Levaduras.....	24
Enterobacterias.....	25
Género <i>Clostridium</i> .....	25
Bacterias productoras de ácido acético.....	26
Género <i>Bacillus</i> .....	26
Mohos.....	27
Listeria.....	28
Medidas para Prevenir el Deterioro del Ensilaje.....	28
Aditivos.....	29
Operacionalización del Evento de Estudio.....	29
Objetivos de la investigación.....	33
Objetivo General.....	33
Objetivos Específicos.....	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
Tipo de Investigación.....	34
Diseño de Investigación.....	34
Población y Muestra.....	34
Unidad de la Investigación.....	34
Selección del Tamaño de la Muestra.....	35
Sistema de Variables.....	35

Procedimientos de la Investigación.....	35
Diseño de Análisis.....	37
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
Resultados.....	38
Discusión.....	47
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>51</b>
Conclusiones.....	51
Recomendaciones.....	52
<b>Referencias Bibliohemerográficas.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>
Anexo 1. Imágenes de <i>R. acris</i> .....	59
Anexo 2. Siembra en medios de cultivos.....	60

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Análisis bromatológico del botón de oro.....	21
2	Operacionalización del Evento de Estudio <i>Lactobacillus</i> spp.....	30
3	Operacionalización del Evento de Estudio las Comunidades Microbianas.....	31
4	Operacionalización del Criterio de Análisis El Proceso de Ensilaje.....	32
5	BAL detectadas en agar MRS relacionadas con el tiempo de ensilaje	37
6	Organismos fúngicos detectados en agar SD relacionados con el tiempo de ensilaje.....	38
7	Clasificación morfológica y proporción de los organismos fúngicos detectados en SD.....	41

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## TABLA DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	Ubicación de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> en los taxones superiores del Dominio Bacteria.....	16
2	Curva Típica de Crecimiento Bacteriano: a) Fase de Latencia, b) Fase Logarítmica, c) Fase Estacionaria y d) Fase de Muerte.....	19

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## TABLA DE GRÁFICOS

<b>Nº</b>		<b>Pág.</b>
1	Valores de pH en el tiempo .....	39
2	Valores de temperatura °C en el tiempo.....	39
3	Proporciones correspondientes a morfología colonial y morfología hallada según la coloración de Gram en BAL presentes en el agar MRS.....	40
4	Cambios en las comunidades microbianas en relación con el tiempo del ensilaje.....	42
5	Variaciones en las comunidades microbianas asociadas al proceso de ensilaje en T1.....	43
6	Variaciones en las comunidades microbianas asociadas al proceso de ensilaje en T2.....	44
7	Variaciones en las comunidades microbianas asociadas al proceso de ensilaje en T3.....	45



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS  
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Biotecnología aplicada



***Lactobacillus* spp. Y COMUNIDADES MICROBIANAS ASOCIADAS AL PROCESO DE ENSILAJE EN SILOS A PARTIR DE *Ranunculus acris* (BOTÓN DE ORO)**

**Autora:**

Prieto Quintero, María Antonieta  
CI: 25.151.637

**Tutor:**

Prof. José Manuel Jiménez

**RESUMEN**

*Lactobacillus* spp., son microorganismos fermentadores pertenecientes a las bacterias ácido-lácticas (BAL), forman parte de la filósfera de muchas plantas junto con otras comunidades microbianas. En el proceso de ensilaje las interacciones y variaciones intrínsecas de este microambiente son el resultado del metabolismo fermentativo de las BAL. El objetivo de este trabajo consistió en comparar los cambios en la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp., asociados al proceso de ensilaje en los distintos silajes a partir de *R. acris*. El diseño de esta investigación fue de laboratorio, contemporáneo y bivariable. Se tomaron 5 muestras los días 0, 4, 7, 14 y 21, de tres tipos de silajes elaborados solo con *R. acris* (T1), *R. acris* y papelón (T2) y la mezcla anterior más un inóculo de probióticos (T3). El diseño de análisis tuvo un enfoque cuantitativo, los resultados se plasmaron en tablas, gráficos de barra y otros, permitiendo así la comparación e interpretación de los datos. En los resultados se obtuvo que T2 y T3, presentaron un crecimiento exponencial en sus concentraciones de BAL luego del día 7, el silaje T1 alcanzó el mayor número de colonias fúngicas, los menores valores de pH fueron registrados por T3, la presencia de BAL como organismos epífitos y aún más la utilización de aditivos e inoculantes fueron esenciales para el proceso de fermentación lo cual mejoró significativamente las condiciones de calidad del ensilaje, puesto que, indujeron a un aumento de las BAL en corto tiempo, esto a su vez conllevó al descenso en los valores de pH y el mantenimiento de cantidades exiguas de colonias de hongos.

Palabras Clave: Proceso de ensilaje, comunidades microbianas, comunidades fúngicas, bacterias ácido-lácticas (BAL), fermentación.

# INTRODUCCIÓN

## Antecedentes del Problema

*Lactobacillus* spp., son microorganismos no patógenos que pertenecen a la clasificación de BAL de la familia *Lactobacillaceae*, de tinción Gram positiva, crecen en hábitats con azúcares fermentables, se caracterizan a su vez por la ausencia de la enzima catalasa y ser organismos no móviles. Se describen como homofermentativos y heterofermentativos refiriéndose a su metabolismo, el cual utiliza como combustible los hidratos de carbono en su mayoría, para el posterior desdoblamiento y conversión en ácido, alcohol y gases. Es casual encontrarlos en productos como los lácteos, vinos, ensilajes, granos, el tracto gastrointestinal y la vagina de animales o en humanos<sup>1,2</sup>.

Las comunidades microbianas representan el conjunto de gremios constituidos por diversas poblaciones celulares que interactúan entre sí, coexisten, se relacionan y desarrollan múltiples actividades funcionales, a través de complejas vías metabólicas, enmarcadas por un contexto ambiental y biológico. La correcta integración de los microbiomas se regula mediante autoinductores, estos son señales bioquímicas a propósito de lograr la comunicación entre especies y sus allegados en el nicho ecológico. Diversas variaciones en el entorno causadas por elementos bióticos o abióticos, pueden perturbar la distribución y riqueza de las comunidades, favoreciendo o perjudicando a un determinado conjunto, haciendo que predominen más individuos, pero haya menos especies<sup>3-6</sup>.

En el proceso de ensilaje se desarrollan una serie de fenómenos fisicoquímicos, mediados por los microorganismos epífitos de la planta forrajera, diversos y variados quienes en un principio consumen el oxígeno presente en el medio, y otros recursos permitiéndoles su multiplicación en la fase denominada aeróbica, posteriormente las condiciones de microaerobiosis generadas constituyen el determinante en la reducción de las muchas poblaciones microbianas; por el contrario las BAL encuentran un ambiente propicio en la denominada fase de fermentación, son las principales causantes

de la acidificación del medio y generación de un entorno hostil, que da pie a la tercera fase de estabilidad, en la cual los cambios son muy leves, la permanencia y predominio se ve inclinado a las BAL; finalmente en la última fase luego de la apertura del sistema y entrada del aire, microorganismos como mohos y enterobacterias inducen al deterioro del material forrajero<sup>7-9</sup>.

Esta investigación está respaldada por las siguientes aproximaciones teóricas sobre el metabolismo bacteriano, la microbiota en *Ranunculus acris* y los cambios en las comunidades microbianas en relación con el tiempo de ensilaje, la primera de estas, el metabolismo bacteriano se refiere a un proceso que les permite a dichos microorganismos extraer de los compuestos tales como las pentosas y hexosas, la energía necesaria para llevar a cabo su crecimiento y reproducción. Pueden ser heterótrofos o autótrofos, según las necesidades de oxígeno se distinguen como anaeróbicas y aeróbicas, este proceso se lleva a cabo mediante dos vías Embden-Meyerhof-Parnas/Glucólisis y la respiración aeróbica, generando como producto el piruvato y posteriormente su transformación en ácido láctico u otros compuestos como alcohol y gases<sup>1,2,10</sup>.

La segunda hace referencia a los variados microorganismos que colonizan las partes externas del forraje *R. acris*, la permanencia de estos microbios depende directamente del aire, agua y suelo, se han detectado altos niveles de bacterias, levaduras y mohos procedentes en dichos elementos, los cuales contaminan la planta durante su crecimiento. Es así, como se han aislado ciertas comunidades compuestas por: Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae y Sphingomonadaceae en flores, mientras Sphingomonadaceae, Metilobacteriaceae y Cytophagaceae en hojas<sup>11</sup>.

La tercera denota, que los cambios en las comunidades microbianas durante el ensilaje se basan en el proceso de fermentación láctica, llevado a cabo por las BAL presentes en la superficie del forraje, que luego de generarse las condiciones propicias para su desarrollo, un ambiente en microaerobiosis, inducen a través de sus metabolitos la variación en la composición de la filósfera y de las propiedades físicas como el pH del medio. A su vez muchas de las sustancias producidas por las BAL tienen un efecto antagonista frente a

las colonias fúngicas y otras bacterias presentes, transformando así el entorno heterogéneo inicial en uno menos rico y diverso en cuanto a los microorganismos se refiere<sup>5,8,12</sup>.

Las relevantes aplicaciones de las BAL han sido motivo de estudio en diferentes países en los últimos cinco años, destacándose un metanálisis (2021) donde se examinaron los efectos de la inoculación con bacterias basadas en *Lactobacillus buchneri* (LB) (LBB), incluyendo LB solo o LB con lactobacilos heterolácticos homolácticos u obligados, sobre fermentación del ensilaje, estabilidad aeróbica (EA) y rendimiento animal. Se recopilaron datos de 158 estudios para revisar los efectos de la inoculación de LBB. En todos los tipos de forraje, el tratamiento con LBB disminuyó la concentración de lactato, aumento el pH, concentraciones de acetato; 1,2 propanodiol y propionato; hubo una disminución de los recuentos de levadura y moho; contribuyó a una mayor EA. En los efectos sobre el rendimiento de las vacas lecheras lactantes, se analizaron doce publicaciones, resultando que no afectó la calidad de la leche. Sin embargo, sugirieron mayores estudios para constatar mencionado fenómeno<sup>13</sup>.

Da Silva É, Costa D, Santos E, Moyer K, Hellings E, Kung L. (2021). Publicaron recientemente un estudio referente a la evaluación de la capacidad de un inoculante que contiene una combinación de *Lactobacillus hilgardii* (LH) y LB (LHLB) para modificar el microbioma y mejorar la EA del ensilaje de maíz de planta completa después de varias longitudes del ensilaje. Se realizaron cinco tipos de silajes, cada uno de los cuales fue inoculado, se incluyeron el control positivo y el control no tratado (CTR). Los ensilajes tratados tenían una comunidad bacteriana menos rica y diversa, dominada por BAL, con una mayor abundancia relativa (AR) de *Lactobacillus*, una mayor concentración de ácido propiónico y también afectó la composición de la población fúngica. El inóculo LHLB mejoró la calidad del silaje después de un corto período<sup>14</sup>.

En Ecuador (2018) se realizó el aislamiento, selección e identificación de *Lactobacillus* spp., con potencial probiótico y tecnológico del tracto digestivo de los pollos de traspatio, obteniendo 100 cepas entre las cuales 54 mostraron características propias de la especie, posteriormente 2 de ellas resultaron como

posibles probióticos, las mismas fueron identificadas como *Lactobacillus brevis* y luego de sobrevivir en condiciones hostiles *in vitro* se concluyó que tienen potencial para ser utilizadas como probióticos<sup>15</sup>.

La justificación debe responder a los por qué o razones de la investigación. Específicamente, estas razones pueden ser categorizadas como necesidades, curiosidades, preocupaciones, motivaciones, intereses, valores, potencialidades, oportunidades, tendencias y contradicciones<sup>16</sup>. La autora de esta investigación identificó razones dentro de las cuales destaca:

Vista como una oportunidad biotecnológica, los *Lactobacillus* spp., en numerosas investigaciones han sido aislados para luego ser adicionados a los ensilajes de distintas plantas, hecho con el fin de mejorar las propiedades alimenticias del forraje, dispuesto para diversos tipos de ganado. Estas bacterias participan efectivamente en la degradación de los carbohidratos presentes en el medio, así como la preservación del preparado, lo cual contribuye al aumento en la carga animal<sup>9,17,18</sup>.

Considerando lo anteriormente explicado, surge como motivación las diversas propiedades biotecnológicas aplicadas a los lactobacilos en el campo de la industria agroalimentaria<sup>19,20</sup>. En muchos países los forrajes ensilados son muy apreciados como alimento animal. En Europa, los agricultores de países como Holanda, Alemania y Dinamarca, almacenan más de 90 por ciento de sus forrajes como ensilaje. Esta es una tendencia en auge, que justifica la inversión tiempo y recursos en investigar temas similares<sup>8</sup>.

Para producir un ensilaje de buena calidad, es esencial asegurar que se produzca una buena fermentación microbiana en el ensilado. Por lo cual, se hace necesario conocer las distintas formas de mejorar el mencionado proceso<sup>8</sup>.

Con categoría de oportunidad, el potencial nutricional de los silajes de *R. acris* ha sido estudiado como una buena fuente de alimento para distintos tipos de ganado, a quienes puede estar destinado los silajes que se elaboren a partir de esta planta, entonces se explica una de las razones para estudiar la población vegetal referida<sup>18</sup>.

Es también visto como una potencialidad las numerosas bondades de estas células bacterianas (lactobacilos), que, siendo parte de la microbiota de una gran cantidad de estructuras anatómicas, no sólo en el ser humano, sino también en muchos animales y plantas, participan en el proceso de la digestión, desarrollo de la mucosa intestinal y del sistema inmune, ejercen en quienes los consumen el denominado efecto probiótico<sup>21</sup>.

También se hace mención a una curiosidad, la cual consiste en conocer la variación de las comunidades microbianas a lo largo del proceso de ensilaje, aportando a su vez, noción de la diversidad de organismos presente en *R. acris*, de la misma forma cómo se ven modificadas según los distintos aditivos presentes en los silajes<sup>5,8</sup>.

Luego de exponer las razones de la investigación, se considera que la detección de los *Lactobacillus* spp., y las comunidades microbianas, proporcionó evidencia acerca de los cambios que ocurren durante el proceso de ensilaje, siendo este, un tema de interés para la biotecnología microbiana y aún de mayor importancia para la agropecuaria, industria alimentaria e incluso farmacéutica<sup>2,5,19</sup>.

Hurtado (2010)<sup>16</sup>, se refiere al alcance de una investigación como la amplitud y la profundidad del conocimiento que se quiere aprender. En tal sentido, el verbo del objetivo general es la cúspide del conocimiento adquirido durante la realización de un trabajo científico, el mismo se refiere a la profundidad del estudio a desarrollar. La presente investigación tiene como alcance comparar los cambios en la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp., asociados al proceso en los distintos silajes elaborados con *R. acris*.

En última instancia, de los alcances de la investigación Hernández, Fernández y Batista<sup>22</sup>, hacen referencia a otros aspectos importantes de tomar en cuenta como lo son la disponibilidad de recursos financieros, humanos y materiales, sin los cuales se presentarían grandes limitaciones en la elaboración del trabajo, es por ello que se ha identificado como posible factor limitante, el alto costo de los instrumentos para la realización de las distintas técnicas, en el aislamiento de microorganismos y medición de la mayoría de los

parámetros pertinentes, en el estudio de los cambios propios de un ensilaje; a su vez también el presente estudio se encontrará restringido por el poco material del cual se dispone para llevar a cabo el logro final.

### **El Problema**

Después de describir la situación actual del problema, se formula el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cómo varía la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp, según el proceso en los distintos silajes elaborados con *Ranunculus acris*, en el Laboratorio Probiovital C.A. ubicado en el sector Chamita, Mérida, Edo. Mérida desde abril hasta junio de 2023?

### **Antecedentes Teóricos**

#### **Trabajos Previos**

Arriola K, Oliveira A, Jiang Y, Ferraretto L, Vyas D y Adesogan A. (2021)<sup>13</sup>. Realizaron una investigación que reposa en la Revista de ciencia láctea, titulada: Metaanálisis de los efectos de la inoculación con *Lactobacillus buchneri* (LB), con o sin otras bacterias, en fermentación de ensilaje, EA y rendimiento de vacas lecheras. Su logro final consistió en examinar los efectos de la inoculación con LBB, incluyendo LB solo o LB con lactobacilos heterolácticos homolácticos u obligados, sobre la fermentación del ensilaje, EA y rendimiento animal. El estudio es de tipo metaanálisis, se orientaron hacia el modelo propuesto por el diagrama prisma, que describe el proceso de recopilación de datos pertinentes para dicha publicación. Se buscaron artículos publicados de 1.997 a 2.020 utilizando los términos “ensilaje”, “*Lactobacillus buchneri*” y “vacas lecheras”, se incluyeron en la búsqueda estudios sobre los efectos de los inoculantes LB en el rendimiento de las vacas lecheras. Para la selección de las investigaciones se utilizaron criterios de inclusión y exhaustivos procesos de tamización. Se recopilaron datos de 158 estudios para

revisar los efectos de la inoculación de LBB en la fermentación y la estabilidad del ensilaje de distintas plantas. Las tasas de aplicación más comunes para la inoculación de LBB fueron  $10^5$  y  $10^6$  las unidades formadoras de colonias (UFC)/g de forraje fresco. La mayoría de los estudios utilizaron silajes de laboratorio. En todos los tipos de forraje, la inoculación de LBB disminuyó la concentración de lactato, aumentó el pH y las concentraciones de acetato, 1,2 propanodiol y propionato; hubo una disminución de los recuentos de levadura y moho y contribuyó a una mayor EA, para lo cual se necesitó al menos 45 días del proceso de fermentación. En los efectos del ensilaje inoculado de alimentación, sobre el rendimiento de las vacas lecheras lactantes, se analizaron 12 publicaciones para investigar los efectos de la inoculación de LBB, en el rendimiento de las vacas lecheras, resultando que no afectó el rendimiento de la leche, digestibilidad de la materia seca, eficiencia del alimento y porcentaje de grasa de la leche. Sin embargo, la inoculación del ensilaje, se asoció con una pequeña reducción en la concentración de proteínas de la leche, lo cual fue controversial por las propiedades coadyuvantes de estos microorganismos. Este trabajo es de importancia para la presente investigación, ya que sus autores poseen un evento de estudio similar, en el cual se hace mención, al efecto de la inoculación de algunas especies de lactobacilos sobre la calidad del ensilaje.

Da Silva É, Costa D, Santos E, Moyer K, Hellings E, Kung L. (2021)<sup>14</sup>. Son los autores de una publicación denominada los efectos de LH 4785 y LB 40788 sobre el microbioma, la fermentación y la EA del ensilaje de maíz ensilado varias veces, la cual se halla en la Revista de ciencia láctea y cuenta con un máximo alcance de evaluar la capacidad de un inoculante, que contiene una combinación de LHLB, para modificar el microbioma y mejorar la EA del ensilaje de maíz de planta completa, después de varias longitudes del ensilaje. La investigación es de tipo evaluativa, correspondiente con un diseño de campo y laboratorio, contemporáneo, por llevar a cabo la recolecta de los datos durante el desarrollo de la misma. Se usaron plantas enteras de maíz contenidas en 5 pilas, cada uno de los cuales fueron tratados con inoculantes, 1ero LHLB; 2do LB y *Pediococcus pentosaceus* (PP), denominado LB500,

utilizado como control positivo; 3ero LH; 4to LB; finalmente el control no tratado (CTR). Los silajes se abrieron después de 34 y 99 días del ensilado, se determinó la composición de nutrientes, el perfil de fermentación, el microbioma y la EA. Después de 34 días, los ensilajes inoculados tenían un mayor número de BAL, una comunidad bacteriana menos rica y diversa, una mayor abundancia relativa (AR) de *Lactobacillus*, menor AR de *Klebsiella*, y una mayor concentración de ácido propiónico que CTR. La inoculación disminuyó la proporción de ácido láctico a ácido acético. La aplicación de los tratamientos no afectó el número total de levaduras cultivables, pero sí afectó la composición de la comunidad fúngica, reduciendo la AR de Saccharomicetos. Al menos dos de los tratamientos mejoraron la EA frente a CTR, luego de 34 y 99 días. El inóculo LHLB tuvo el mismo comportamiento con respecto a la EA, pero aún, desde un corto período de ensilado, por lo cual, el mismo puede ser útil para los productores alimentar al ganado, poco después de elaborar los silajes. La relevancia de esta publicación, consiste en que su autor posee un evento de estudio similar al del presente manuscrito.

Arteaga F, Laurencio M, Rondón A, Milián G y Bococurt R. (2018)<sup>15</sup>. Llevaron a cabo un trabajo científico, publicado en la Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, titulado aislamiento, selección e identificación de *Lactobacillus* spp., con potencial probiótico y tecnológico del tracto digestivo de pollos de traspatio, cuyo objetivo fue obtener cepas de lactobacilos con potencial probiótico y tecnológico, a partir de la mucosa cecal de pollos de traspatio. La investigación es de tipo analítica con un diseño de laboratorio, contemporáneo, y según la amplitud de la información univariable. Se utilizaron cuatro aves de traspatio *Gallus gallus*, tomando un raspado de la mucosa intestinal de cada una de ellas que luego fue incubado, a partir de esta suspensión se realizaron varias diluciones, las cuales fueron sembradas en agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) y nuevamente incubadas, al finalizar el tiempo prudente se seleccionaron las colonias con las características típicas, se procedió a detectar el potencial probiótico de cada una de las cepas, para lo cual realizaron pruebas tales como disminución del pH, resistencia a pH ácido, capacidad de crecimiento, determinación del ácido láctico y producción de

ácidos grasos de cadena corta y totales. Continuaron con la identificación molecular de los microorganismos candidatos, finalmente experimentaron la tolerancia de estas cepas en condiciones extremas. Se aislaron 100 cepas, 54 fueron preseleccionadas como posibles lactobacilos, 14 de ellas resistieron el pH ácido y las sales biliares al 50 %, la cepa 17LP tuvo los mayores valores en producción de ácidos grasos, se seleccionaron 2 cepas 17LP y 40LP para la identificación, resultando pertenecientes a la especie *L. brevis*, estas fueron consideradas como candidatas a probióticos en aves. La importancia de este trabajo radica en la capacidad antagonista de las BAL, que representa otra de las aplicaciones biotecnológicas, en lo cual pueden ser empleados los inóculos de los mencionados probióticos.

### **Antecedentes Históricos o Epistemológicos del Género *Lactobacillus* y las Comunidades Microbianas**

El origen del estudio de los lactobacilos va de la mano con los inicios de la biotecnología microbiana, González (2012)<sup>19</sup> resalta que el uso de los microorganismos nace hace miles de años, con la manipulación de alimentos por parte de los hombres de edades pretéritas, 'que habían visto por incontables repeticiones que prevenían la putrefacción de los mismos'<sup>19</sup>.

Posteriormente surge la época del pensamiento filosófico en Grecia y Roma, en ella se originan las primeras ideas sobre 'gérmenes invisibles que transmiten enfermedades contagiosas'<sup>23</sup>. Lucrecio (96-55 a.C.) hace varias referencias a "semillas de enfermedad" en alusión a los microorganismos patógenos<sup>24</sup>.

Mendoza menciona que pasaron varios siglos hasta obtener grandes avances en esta materia, lo cual pudiese ser atribuido a la ausencia de la invención de tecnologías, para la observación de estos organismos diminutos<sup>23</sup>. Finalmente, cuando comenzaron a desarrollarse las lentes de cristales y fue fabricado el primer microscopio, en 1.675 el holandés Leeuwenhoek, pudo observar unas pequeñas criaturas a las cuales llamó animáculos, este investigó diversas bacterias, hongos y protozoos, principalmente a partir de muestras de agua, barro e incluso su propio semen. Este hecho representó el origen de la

microbiología, de la mano de Leeuwenhoek, quien también observó la placa dental en la cual se descubrieron las biopelículas, como un primer indicio de microorganismos que interactúan dentro de comunidades complejas<sup>25</sup>.

Posteriormente para 1.857 el gran científico Louis Pasteur realiza investigaciones en la leche agria, para comprender que especie de organismo era el causante de este tipo de fermentación, distinta a la alcohólica de la cual ya se conocía su procedencia, observó en dicha sustancia una gran cantidad de células en forma de bastoncitos, las cuales producían ácido láctico al metabolizar azúcares. Más tarde, Pasteur descubre, que dependiendo del tipo de bacteria puede o no sobrevivir a la exposición del aire, a las cuales llamó anaeróbicas y aeróbicas<sup>23,24</sup>.

Otro personaje destacado fue Robert Koch en el siglo XIX, por su explicación sobre el origen de las enfermedades humanas y animales, como consecuencia de la infección microbiana, este hecho fue un hito importante en la microbiología. Más, sin embargo, investigaciones exhaustivas durante el último siglo, han demostrado que solo una pequeña proporción de microorganismos están asociados con enfermedades o patogenicidad, la gran mayoría son esenciales para el funcionamiento del ecosistema y son conocidos por sus interacciones beneficiosas con homólogos y macroorganismos<sup>25</sup>.

Para finales de los años 90 se introdujo un nuevo concepto, la ecología microbiana que comenzó con el trabajo de Martinus Beijerinck y Sergei Winogradski. El descubrimiento de ADN, el desarrollo de tecnologías de secuenciación, PCR y técnicas de clonación permitieron la investigación de comunidades microbianas utilizando enfoques basados en ADN y ARN, independientes del cultivo. Otro paso importante fue la introducción de marcadores filogenéticos como el gen 16S rRNA, para el análisis de comunidades microbianas por parte de Carl Woese y George Fox en 1977<sup>25</sup>.

Finalmente, con la llegada del nuevo siglo se introdujo otro cambio de paradigma, ya que las nuevas tecnologías de secuenciación y los datos acumulados, han resaltado tanto la ubicuidad de las comunidades microbianas en asociaciones dentro de organismos superiores, como los roles críticos de

los microbios en seres humanos, animales, vegetales y otros. Estas nuevas posibilidades han revolucionado la ecología microbiana a través del análisis de genomas y metagenomas. Las tecnologías multiómicas, ahora brindan información detallada sobre las actividades microbianas en interacción con el medio ambiente<sup>25</sup>.

## **Bases Teóricas**

### **Aproximación Teórica sobre Metabolismo Bacteriano**

Las bacterias necesitan de un metabolismo que les permita extraer de las sustancias la energía necesaria para llevar a cabo sus procesos vitales. En este contexto, dependiendo de la nutrición, ya sea a partir de sustancias orgánicas o inorgánicas, se les puede diferenciar como heterótrofas o autótrofas respectivamente, siendo así que las bacterias heterótrofas tienen como única fuente de alimento los azúcares. La utilización o no del oxígeno como aceptor final de la cadena de electrones, ha añadido otra clasificación para estos organismos las cuales pueden ser aeróbicos o anaeróbicos; para el primero de estos, la degradación de azúcares se realiza mediante la respiración aeróbica, por el contrario, en la segunda el proceso que se lleva a cabo es la fermentación; produciendo en ambos casos piruvato, luego es degradado a través de rutas complejas para la formación de ácido, alcohol y gases, lo cual atribuye a las bacterias una última denominación como heterofermentativas u homofermentativas en el caso de transformar el piruvato en un único producto, el ácido láctico<sup>1,2,10,26,27</sup>.

## **Aproximación Teórica sobre la Microbiota en *R. acris***

Las propiedades químicas como la disponibilidad de carbono o nitrógeno, condiciones biogeográficas específicas como el clima, el agua, el suelo, el pH y la humedad u otros factores abióticos y bióticos son importantes para la determinación de las comunidades microbianas asociadas a las plantas, siendo estas las principales fuentes de contagio, con las cuales está en continuo contacto desde sus inicios y en todo el desarrollo, por lo tanto son las mismas quienes definen la variabilidad y riqueza de los microorganismos epifitos. Los microbiomas florales están potencialmente influenciados por otras poblaciones como la rizósfera y la filósfera. Es probable que los colonizadores bacterianos de flores se transmitan a través del aire y la lluvia, e incluso animales, especialmente los polinizadores. En el caso especial de *R. acris* se han identificado Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae y Sphingomonadaceae como los taxones más abundantes en las flores, mientras *Sphingomonadaceae*, Metilobacteriaceae y Cytophagaceae dominó las comunidades bacterianas en las hojas<sup>11</sup>.

## **Aproximación Teórica sobre los Cambios en las Comunidades Microbianas en Relación con el Tiempo de Ensilaje**

Es el resultado del proceso de fermentación láctica que se desarrolla de forma espontánea, luego de almacenar la planta e iniciar el consumo de oxígeno por parte de la respiración vegetal y los microorganismos aeróbicos, inducen un ambiente propicio para la proliferación de las BAL presentes en la diversa filósfera del forraje, quienes son las principales encargadas de la degradación de los carbohidratos en su necesidad de obtención de energía, produciendo así sustancias como el ácido láctico, ácido acético, propanodiol y sus derivados, así como también otros ácidos grasos de cadena corta (SCFAs).

Es así que las hostiles condiciones generadas (anaerobiosis y acidez) son en parte los causantes de los cambios en el microambiente de un silaje, a su vez algunos de los productos derivados de la fermentación tienen acción

antagonista sobre las comunidades fúngicas y bacterias vecinas, razón por la cual las BAL se convierten en la población predominante a medida que transcurre el tiempo, e impiden que el proceso de putrefacción del vegetal se desarrolle, de esta manera ocurren profundas variaciones en las condiciones físicas y en el heterogéneo microbioma inicial, para transformarse en un entorno menos rico y diverso en cuanto a los microorganismos se refiere, pobre en oxígeno y abundante en SCFAs<sup>5,8,12</sup>.

### **Biotechnología Microbiana**

Se encarga de aportar bienes y servicios para la población mediante el uso de sistemas biológicos, específicamente la explotación de los microorganismos e incluso de sus organelas y moléculas constituyentes, entre ellos hongos, bacterias, levaduras y otros, los cuales son obtenidos o aislados mediante técnicas adecuadas como la incubación en cultivos. La biotecnología es una variada disciplina que tiene sus orígenes en la fermentación natural de los vinos y la elaboración de cervezas, así como también en la adición de semillas microbianas a los alimentos; siglos más tarde el desarrollo de métodos y técnicas de aislamiento, permitió la selección de los microorganismos deseados y así incluirlos en el comercio y la industria agrícola, ambiental, medicinal entre otras<sup>2,19</sup>.

### **Efecto Probiótico**

Proviene de la interacción y las propiedades desarrolladas por algunos microorganismos y sus componentes que al ser ingeridos en cantidades adecuadas, estableciéndose como parte de la microbiota del hospedador, confieren beneficios en pro de la salud del individuo, tales como la reducción de síntomas de mala digestión de la lactosa, reducción de hipercolesterolemia, disminución de la duración y la gravedad de los procesos diarreicos, mejora la barrera de permeabilidad intestinal, prevención de algunos tipos de cáncer, incremento de la respuesta a infecciones intestinales o extraintestinales,

atenuación de la enfermedad inflamatoria intestinal, y prevención de alergias (especialmente intestinales) <sup>10,21,28-30</sup>.

Muchos son los mecanismos de acción que llevan a cabo dentro del huésped, tienen efectos directos sobre el epitelio, la inmunidad de las mucosas, así como también previenen la adherencia, el establecimiento, la replicación y los efectos de las bacterias nocivas, ya sea a través de las múltiples sustancias que librea al medio o por la interacción con las células propias del tejido y las células inmunocompetentes, en la mayoría de los casos para regularlas, estimularlas o activarlas, demostrando así que tienen la capacidad de potenciar los mecanismos defensivos sin una contrapartida proinflamatoria <sup>10,21,28-30</sup>.

### **Bacterias Ácido-lácticas (BAL)**

Ortiz, hace referencia a la historia de Weigman, un científico que en el año 1899 definió este tipo de bacterias como microorganismos formadores de leche acida a partir del azúcar presente en este líquido<sup>27</sup>.

Se identifican como cocos o bacilos Gram positivos no esporulados, fermentadores de carbohidratos con producción de ácido láctico, microaerobios, tolerantes a los ácidos, catalasa y oxidasa negativa<sup>27</sup>.

### **Clasificación de las BAL**

Los géneros tradicionales fueron nombrados por Ortiz en su investigación tales como '*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, han sido ampliados para incluir en este grupo de bacterias los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* (...). Si bien el grupo de las BAL está definido vagamente con límites imprecisos, todos sus representantes comparten la propiedad de producir ácido láctico a partir de las hexosas<sup>27</sup>.

## Importancia de las BAL en la Industria

Se describen como organismos de gran importancia para la industria, derivado de sus propiedades y el uso biotecnológico que presentan, Ortiz resalta la:

'(...) capacidad fermentativa, así como (...) sus beneficios nutricionales para la salud humana. Las especies usadas para la fermentación de los alimentos pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Estos microorganismos han sido aislados de granos, plantas verdes, productos lácteos y cárnicos, vegetales fermentados y las mucosas de animales, Desde que se usaron en forma empírica para retardar el deterioro de los alimentos a través de fermentaciones naturales, han tenido aplicación comercial como cultivos iniciadores en las industrias de lácteos, panaderías, cárnicos, vegetales y bebidas alcohólicas<sup>127</sup>.

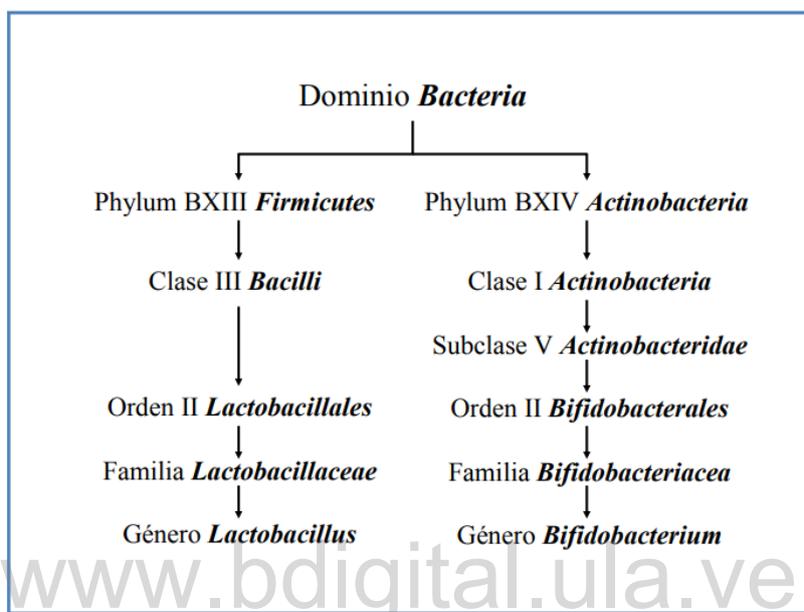
De forma coherente Garcés, Berrio, Ruíz, Serna y Builes aportan al texto anterior la relevancia de las BAL para la industria pecuaria, mediante el uso de las mismas como protagonistas en los procesos de ensilajes y resaltan el efecto benéfico de su implementación:

'(...) la fermentación láctica que realizan los microorganismos (BAL) da un valor agregado a los productos vegetales porque mejora su contenido nutricional, digestibilidad y palatabilidad. También permite manejar los pastizales como un cultivo de corte y no exclusivamente como zona de pastoreo, lo cual mejora la rentabilidad y eficiencia de las explotaciones ganaderas. Además, se produce un alimento natural, ecológico y más económico que los concentrados<sup>9</sup>.

## Unidad Taxonómica de los Probióticos

La mayoría de los microorganismos más comúnmente usados como probióticos son BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Otras especies de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, así como cepas no patógenas de *E. coli* y ciertas cepas de bacilos y levaduras pueden actuar también como probióticos<sup>21</sup>.

Las principales bacterias usadas como agentes probióticos de la especie *Lactobacillus* (ver Figura 1) son *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuter*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. lactis*; las especies *Bifidobacterium* son *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. adolescentes*<sup>21</sup>.



**Figura 1. Ubicación de los Géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en los Taxones Superiores del Dominio *Bacteria*<sup>21</sup>.**

### **Clasificación del Género *Lactobacillus***

Samaniego cita a Kandler y Weiss, los cuales agrupan a los lactobacilos en los tres conjuntos tradicionales establecidos por Orla-Jensen: termobacterias, estreptobacterias y betabacterias, sin tener en cuenta las temperaturas de crecimiento ni la morfología. Grupo I (Termobacterias representativas y nuevas especies descritas): Lactobacilos homofermentativos obligados, fermentan las hexosas originando un único producto el ácido láctico. Entre estas especies y subespecies se encuentran: *L. delbrueckii* subsp. *Delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, entre otros. Grupo II (Estreptobacterias típicas y nuevas especies descritas): Lactobacilos heterofermentativos facultativos,

fermentan las hexosas para producir en su mayoría ácido láctico y en algunas especies ácido acético, etanol y ácido fórmico. También pueden fermentar las pentosas. Entre estas especies y subespecies se encuentran: *L. agilis*, *L. alimentarius*, *L. bavaricus*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudopiantarum*, *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. casei* subsp. *tolerans*. Grupo III (Betabacterias características y nuevas especies descritas): Lactobacilos heterofermentativos obligados, fermentan las hexosas a ácido láctico, ácido acético (etanol) y dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>). También fermentan las pentosas, entre estas especies y subespecies se encuentran: *L. bifermantans*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides*, *L. confusus*, *L. divergens*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*<sup>29</sup>.

### Hábitat de lactobacilos

Forman parte de la microbiota de muchas plantas, así como de algunas mucosas en los seres humanos, Samaniego afirma que:

'Los lactobacilos pueden encontrarse en productos lácteos, quesos, granos, productos cárnicos o de pescado, agua, aguas cloacales, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, col y otros vegetales fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas, aunque también forman parte de la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales de temperatura estable, incluyendo al hombre'<sup>29</sup>.

En este contexto los lactobacilos presentes en el cuerpo humano han sido motivo de gran estudio, es el caso de Sánchez quien logró aislar 24 cepas de muestras vaginales de 198 mujeres sanas de la provincia Mayabeque, Cuba<sup>10</sup>.

En este mismo orden de ideas otros autores explican que los lactobacilos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en hábitats como el tracto gastrointestinal de humanos, peces y también en plantas. Esta gran variedad de entornos abarca a su vez diversas condiciones ambientales, en las cuales pueden desarrollarse estos microorganismos; un ejemplo de ello es la alta tolerancia a condiciones de acidez, que les permite llevar a cabo fermentaciones de productos alimentarios, principalmente vegetales. Del mismo modo su capacidad para resistir a distintas temperaturas ya sea alta o

baja, permite a estas espléndidas bacterias tener nichos ecológicos diversos y heterogéneos<sup>31</sup>.

### **Medios de Cultivo para el Aislamiento de BAL**

En general las BAL son exigentes nutricionalmente, requieren de carbohidratos, aminoácidos y factores de crecimiento. Para su aislamiento se utilizan varios medios de cultivo, tanto selectivos como diferenciales, entre los que se encuentran el agar MRS, el agar APN (Actidiona-polimixina-nitrito), el agar Lee y el agar de Chalmers<sup>27</sup>.

En el agar MRS se tiene un buen desarrollo de bacterias aisladas de productos lácteos y fuentes humanas al agrupar la acción estimulante del citrato, acetato de sodio, tween 80 y sales de  $Mn^{2+}$ . El agar APN tiene un carácter selectivo debido al nitrito, el cual es tolerado por las bacterias lácticas, la actidiona inhibidor de levaduras y la polimixina inhibidor de bacterias Gram negativas. El agar de Lee permite la diferenciación entre algunas especies gracias a la acción fermentativa sobre los azúcares que contiene el medio. Finalmente, el agar de Chalmers, en este medio de cultivo se puede diferenciar las bacterias por su morfología colonial, de otros microorganismos Gram positivos, Gram negativos, levaduras y hongos filamentosos<sup>27</sup>.

### **Características Microscópicas de las Células Bacterianas del Género**

#### *Lactobacillus*

Para apreciar estas características una de las técnicas usadas es la tinción de Gram, la cual se observa mediante un microscopio obteniendo que las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* son bacilos Gram positivos largos y cortos<sup>32</sup>.

## Curva de Crecimiento Bacteriano

Cuando una población bacteriana crece, hay un incremento del número de células como consecuencia de la división celular. En la Figura 2, se muestra la curva típica de crecimiento bacteriano donde el aumento exponencial representa una parte específica del ciclo (fase LOG o logarítmica), antes de la fase LOG se presenta el periodo inicial (fase LAG o de latencia), posterior a la fase LOG se presenta una fase estacionaria y finalmente la población desciende con la fase de muerte<sup>33</sup>.

La fase de latencia es un periodo de adaptación, además de ser la etapa donde el metabolismo celular se mantiene muy activo, ya que toman los nutrientes del medio para iniciar el proceso de división, aunque temporalmente la población no aumenta. En la fase estacionaria tiende a cesar el crecimiento, se debe a varios factores, pero principalmente a la disminución de los nutrimentos en el medio y a la acumulación de sustancias tóxicas o inhibitorias producidas durante el desarrollo de estos organismos. Al prolongarse el efecto de los cambios generados en el medio por la actividad metabólica de las bacterias, comienzan a declinar en número, se presenta entonces, la fase de muerte durante la cual la población decrece exponencialmente<sup>33</sup>.

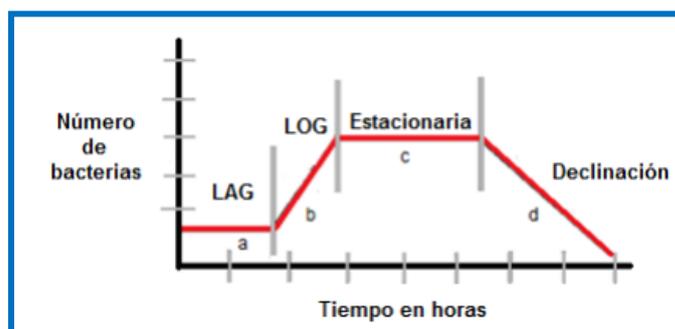


Figura 2. Curva típica de crecimiento bacteriano: a) fase de latencia, b) fase logarítmica, c) fase estacionaria y d) fase de muerte<sup>33</sup>.

## Capacidad Antagonista de Los Lactobacilos

Ruíz menciona que el género *Lactobacillus* ha sido usado de forma exitosa para el control de ciertos microorganismos patógenos, capacidad atribuida a sustancias denominadas bacteriocinas. Las moléculas finales de su metabolismo tales como el ácido láctico, acético y propiónico tienen propiedades antibacterianas y antimicóticas<sup>7,14</sup>.

Aunado a ello, Samaniego postuló que, entre la variedad de sustancias antimicrobianas producidas por las BAL se encuentran las ya mencionadas bacteriocinas, son sintetizadas ribosomalmente como proteínas o polipéptidos precursores, presentan un efecto bactericida contra una variedad limitada de especies, también pueden producir otras sustancias inhibitorias tales como diacetilo y peróxido de hidrógeno, lo cual les atribuye su capacidad antagónica frente a otros microorganismos<sup>29</sup>.

### Ácidos Grasos Volátiles

También denominados ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) son moléculas orgánicas producidas por los microorganismos como parte de su metabolismo, tienen actividad bacteriostática o bactericida al modificar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, lo cual aumenta la permeabilidad y permite la lisis de la célula. Por otra parte, los SCFAs estimulan el crecimiento de las células de la mucosa colorrectal, retardan la atrofia de la mucosa y disminuyen el riesgo de malignidad en el colón. Entre ellos se pueden mencionar el ácido fórmico, el acético, el propiónico, el butírico, el isobutírico, el 2-metil butírico, entre otros<sup>21</sup>.

### Características Generales de *R. acris* (Botón de oro)

*Ranunculus acris* es una hierba conocida como botón de oro, Hierba belida, Hocico de cochino, Medadow buttercup, Renoncule de fries, bassinet, renoncule des prés. Scharfer hahnenfuss, butterblume, perteneciente a la

familia Ranunculaceae. Tiene una altura de 20 a 50 cm, sus hojas son palmeadas y con fuertes divisiones, las flores de color amarillo brillante tienen cinco pétalos y gran cantidad de estambres. Es una planta salvaje distribuida en una gran parte de Europa, Asia y América del Norte. Crece en prados y claros de bosque. Los miembros de este género producen el glucósido ranunculin, que a través de la descomposición enzimática después de la ingestión inadvertida por parte de los animales de pastoreo, forma la protoanemonina la cual puede llegar a producir efectos adversos sobre el ganado. Mas sin embargo, en distintas publicaciones se presenta información valiosa sobre la composición química y valor nutritivo del *R. acris*, esto permite considerar diferentes alternativas para su aprovechamiento, que tradicionalmente se hace del uso como forraje mediante ensilado. Autores tales como García, Villa, Hurtado, Camacho y Meneses en distintos trabajos científicos afirman a través de sus experimentos que botón de oro es una planta con un importante valor nutricional (ver Tabla 1), principalmente por su capacidad para la acumulación de nitrógeno y por el nivel de fibra bruta, dichas características son similares a las de otros arbustos destinadas a la producción forrajera<sup>18,34-38</sup>.

**Tabla 1. Análisis bromatológico del botón de oro**

Número de días de cosecha	30	60	89
<b>Proteína total (porcentaje)</b>	26,5	22,00	14,84
<b>Materia seca (porcentaje)</b>	14,1	17,25	29,25
<b>Fibra cruda (porcentaje)</b>	3,83	1,63	2,7
<b>Cenizas (porcentaje)</b>	15	12,72	9,72
<b>Calcio (porcentaje)</b>	2,9	2,47	1,96
<b>Fosforo (porcentaje)</b>	0,38	0,36	0,32
<b>Magnesio (porcentaje)</b>	0,046	0,069	0,059

**Fuente:** Camacho R y Meneses M, 2018.

## Silos

Según Cevallos 'el silo es la instalación, recinto o artificio (bolsas de plástico de cobertura, etc.), donde tiene lugar la fermentación del forraje y posterior almacenamiento del ensilado<sup>39</sup>.

### Elaboración de Silajes a partir de *R. acris*

Villa y Hurtado en su publicación sobre la evaluación nutricional de diferentes ensilajes para alimentar conejos, usaron como parte de las plantas de forraje *R. acris*, en la elaboración de los silajes usaron la siguiente metodología:

'Se utilizaron pasto imperial (70%) *Axonopus scoparius* (Flüggé) Kuhl, mezclado con diferentes forrajes (30%), botón de oro *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, morera (*Morus alba* L.) y ramio (*Boehmeria nivea* L. Gaudich). (...) se sometieron a una deshidratación en campo una vez obtenido un 30 o 40% de pérdida de agua se realizó el picado del material entre 3 y 5cm, aproximadamente. Después de fragmentado el material forrajero se procedió a la mezcla de los mismos, adicionándoles melaza en una proporción de 1Kg por cada 50Kg de forrajes a ensilar. Estas mezclas se empacaron en bolsas negras en forma compacta para extraer el aire y mantenerlas bajo condiciones anaeróbicas (...). Las bolsas de silos se almacenaron en estivas en un lugar limpio, seco y fresco<sup>18</sup>.

## Ensilaje

Solís describe el ensilaje como la fermentación de los carbohidratos solubles del forraje, por medio de BAL en condiciones de anaerobiosis, el producto final es la conservación del alimento a través de la acidificación del medio, lo cual inhibe el desarrollo de microorganismos evitando la putrefacción de dicho preparado. El proceso del ensilaje también es un método utilizado para almacenar alimentos en tiempo de cosecha y suministrarlo en tiempo de escasez, conservando la calidad a bajo costo, a su vez favorece la sustitución o complementación de los concentrados. Es una excelente opción para la alimentación en las ganaderías. En la elaboración de ensilaje puede ser usado

el forraje fresco de cultivos de gramíneas, leguminosas como maíz, trigo y alfalfa, entre otros<sup>7-9</sup>.

## El Proceso de Ensilaje

Una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, el proceso del ensilaje se puede dividir en cuatro etapas:

- **Fase 1 (Fase aeróbica):** En esta fase (dura sólo pocas horas) el oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los materiales vegetales y a los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos como las levaduras y las enterobacterias. Además, hay una actividad importante de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas, siempre que el pH se mantenga en el rango normal para el jugo del forraje fresco (pH 6,5 - 6,0)<sup>8</sup>.
- **Fase 2 (Fase de fermentación):** Esta fase comienza al producirse un ambiente anaeróbico. Dura de varios días hasta varias semanas, dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones en el momento del ensilaje. Si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad de las BAL proliferará y se convertirá en la población predominante. A causa de la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH bajará a valores entre 3,8 a 5,0<sup>8</sup>.
- **Fase 3 (Fase estable):** Mientras se mantenga el ambiente sin aire, ocurren pocos cambios. La mayoría de los microorganismos de la Fase 2 lentamente reducen su presencia. Algunos microorganismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo; otros, como el género *Clostridium* y *Bacillus*, sobreviven como esporas. Sólo algunas proteasas y carbohidrasas, y microorganismos especializados que toleran ambientes ácidos, continúan activos, pero a menor ritmo<sup>8</sup>.
- **Fase 4 (Fase de deterioro aeróbico):** Esta fase comienza con la apertura del silo y la exposición del ensilaje al aire. Esto es inevitable cuando se requiere extraer y distribuir el ensilaje, pero puede ocurrir

antes de iniciar la explotación por daño de la cobertura del silo (p. ej. roedores o pájaros). El período de deterioro puede dividirse en dos etapas. La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje, por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. Esto induce un aumento en el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro; en ella se constata un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos los cuales deterioran el ensilaje. La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aeróbicos como mohos y enterobacterias. El deterioro aeróbico ocurre en casi todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire<sup>8</sup>.

## **Microorganismos Indeseables en los Procesos de Ensilaje**

### **Levaduras**

Las levaduras son microorganismos eucarióticos, anaeróbicos facultativos. En todo ensilaje, tanto la actividad de levaduras anaeróbicas como aeróbicas son indeseables. En ausencia de oxígeno las levaduras fermentan azúcares produciendo etanol y CO<sub>2</sub>, el etanol no sólo disminuye el azúcar disponible, sino que también produce un mal gusto. Ante la exposición al aire muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, la descomposición de dicha sustancia eleva el valor del pH del ensilaje, lo cual a su vez permite el desarrollo de otros organismos indeseables<sup>8</sup>.

La presencia de oxígeno facilita la supervivencia y el desarrollo de las levaduras durante el almacenaje. La actividad inicial de las levaduras parece ser incrementada en forrajes que generan niveles bajos de pH (<5), por ejemplo, cuando se trata de materiales con un alto contenido de azúcares como papas, cáscaras de naranja o remolacha azucarera, o cuando se emplean aditivos ácidos. Bajo estas condiciones el ensilaje resultante tiene concentraciones altas de etanol y bajas en ácido láctico<sup>8</sup>.

## **Enterobacterias**

Las enterobacterias son organismos anaeróbicos facultativos. Se considera que la mayoría de las enterobacterias presentes en el ensilaje no son patógenas. Pese a ello su desarrollo en el ensilaje es perjudicial porque compiten con las BAL por los azúcares disponibles y porque además pueden degradar las proteínas. La degradación proteica no sólo causa una reducción del valor nutritivo del ensilaje, sino que también permite la producción de compuestos tóxicos tales como aminos biogénicas y ácidos grasos de cadena múltiple; se sabe que las aminos biogénicas tienen un efecto negativo sobre la palatabilidad del ensilaje, más aún, el amoníaco generado por la proteólisis aumenta el poder tampón del forraje ensilado, lo cual se opone a un descenso rápido del pH del ensilaje<sup>8</sup>.

Un atributo particular de las enterobacterias es su habilidad, en el proceso de ensilaje para reducir el nitrato ( $\text{NO}_3$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y luego el nitrito en amoníaco, óxido de nitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) o monóxido de nitrógeno ( $\text{NO}$ ). En presencia de aire, el  $\text{NO}$  es oxidado produciendo una mezcla de gases que dañan el tejido pulmonar y pueden causar enfermedades con síntomas parecidos a la neumonía, conocida como enfermedad del ensilaje. A pesar de estos problemas, se considera útil que ocurra una leve reducción de nitritos, ya que los nitritos y el  $\text{NO}$  generados son inhibidores muy potentes de los clostridios y mejoran la calidad del ensilaje<sup>8</sup>.

Las enterobacterias no proliferan en ambientes con valores bajos de pH. Las técnicas de ensilaje en las cuales se asegure un rápido y significativo descenso del pH en el silaje, provocarán una inhibición del desarrollo de las enterobacterias<sup>8</sup>.

## **Género *Clostridium***

Son bacterias anaeróbicas que forman endosporas. Muchas de ellas pueden fermentar tanto carbohidratos como proteínas, por lo cual disminuyen el valor nutritivo del ensilaje y al igual que las endobacterias crean problemas al

producir aminas biogénicas, además la presencia de clostridios en el ensilaje altera la calidad de la leche. La especie de mayor importancia en las lecherías es *Clostridium tyrobutyricum*, un organismo tolerante de bajo pH que puede degradar el ácido láctico en ácido butírico, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Serios problemas de salud pueden ser causados por ciertos tipos de clostridios, *Clostridium botulinum* es una especie extremadamente tóxica produce el botulismo, y puede ser fatal para el ganado bovino, afortunadamente tiene una baja tolerancia a medios ácidos y por ello no se desarrolla en ensilajes bien fermentados<sup>8</sup>.

Un típico ensilaje contaminado por clostridios muestra un alto contenido de ácido butírico, un pH aumentado y alto contenido tanto de amoníaco como de aminas. Las técnicas de ensilaje que permiten una caída rápida y significativa del pH evitarán el problema. Por último, los nitritos y el NO u otros compuestos, también inhibirán el desarrollo de los clostridios<sup>8</sup>.

### **Bacterias Productoras de Ácido Acético**

Estas bacterias son ácido tolerante y aeróbicas obligatorias, han sido aisladas de muestras de ensilaje las pertenecientes al género *Acetobacter*. La actividad de *Acetobacter* spp., en el ensilaje puede iniciar un deterioro aeróbico, ya que puede oxidar el lactato y el acetato produciendo CO<sub>2</sub> y agua<sup>8</sup>.

### **Género *Bacillus***

Los bacilos se asemejan a los clostridios: son bacterias de forma cilíndrica que forman esporas. Sin embargo, se los puede distinguir fácilmente ya que son aeróbicos facultativos, fermentan un amplio rango de carbohidratos generando compuestos tales como ácidos orgánicos o etanol, 2,3-butanodiol y glicerol. Algunos *Bacillus* spp., son capaces de producir sustancias fungicidas y se les ha usado para inhibir el proceso de deterioro aeróbico en ensilajes, con la excepción de esta característica, el desarrollo de los bacilos es en general considerado como indeseable<sup>8</sup>.

Las esporas de *Bacillus cereus* son uno de los organismos más importantes del deterioro de la leche pasteurizada. Altas concentraciones de esporas de *B. cereus* han sido detectadas en ensilajes<sup>8</sup>.

Para disminuir el desarrollo de *Bacillus* en el ensilaje, la temperatura de almacenaje no debería ser muy alta y se deberá minimizar el ingreso de aire, además se debe reducir toda contaminación inicial del ensilaje con tierra o estiércol<sup>8</sup>.

## Mohos

Los mohos son organismos eucarióticos. Es fácil identificar un ensilaje infestado por mohos debido a los filamentos de diversos colores y de gran tamaño que producen muchas especies. Los mohos se desarrollan en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno, inclusive solo trazas. En un buen ensilaje eso ocurre sólo al inicio del almacenamiento y se limita a la capa exterior de la masa ensilada, pero durante el deterioro aeróbico todo el ensilaje puede ser invadido por mohos. Las especies que se han identificado más frecuentemente en el ensilaje pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Byssochlamys*, *Absidia*, *Arthrinium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma*<sup>8</sup>.

Los mohos no sólo disminuyen el valor nutritivo y la palatabilidad del ensilaje, sino que también son un riesgo para la salud de los animales y las personas. Las esporas de mohos pueden asociarse a ciertas afecciones pulmonares y reacciones alérgicas. Otros problemas de salud asociados con los mohos se relacionan con las micotoxinas. *Penicillium roqueforti* es una especie ácido tolerante que puede desarrollarse aún en ambientes con muy poco oxígeno y alta concentración de CO<sub>2</sub> y ha sido detectada como una especie predominante en diversos tipos de ensilajes. Está confirmado que la aflatoxina B1, una micotoxina de *Aspergillus flavus*, puede ser transferida del ensilaje a la leche<sup>8</sup>.

Las técnicas de ensilaje que minimizan el ingreso de aire y la inclusión de aditivos que inhiben el deterioro aeróbico, podrán prevenir o limitar el desarrollo de mohos<sup>8</sup>.

### **Listeria**

Los integrantes del género *Listeria* son organismos aeróbicos o anaeróbicos. Con relación a los efectos negativos sobre la calidad del ensilaje, la más importante especie es *L. monocytogenes*, anaeróbico facultativo, patogénica para varios animales inmunocomprometidos son muy susceptibles a infecciones por este microorganismo. Además, se ha señalado que el uso de ensilaje de mala calidad ha sido una de las fuentes principales de contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes*. El desarrollo y supervivencia de *Listeria* spp., en el silaje está determinado por fallas en asegurar un ambiente anaeróbico, y por la acidez del ensilaje. *L. monocytogenes* puede tolerar concentraciones de pH entre 3,8 a 4,2 por largos períodos en presencia de oxígeno, no siendo así en ambientes estrictamente anaeróbicos<sup>8</sup>.

### **Medidas para Prevenir el Deterioro del Ensilaje**

Para evitar fracasos, es importante controlar y optimizar el proceso de ensilaje de cada fase. En la fase 1, las buenas prácticas para llenar el silo permitirán minimizar la cantidad de oxígeno presente en la masa ensilada. Las buenas técnicas de cosecha y de almacenaje del silo permiten reducir las pérdidas de nutrientes inducidas por respiración aeróbica, dejando así mayor cantidad de nutrientes para la fermentación láctica en la fase 2. Durante las fases 2 y 3 no hay estrategia para controlar el proceso de ensilaje, sin embargo, se puede optar por recurrir a aditivos que se aplican en el momento del ensilado. La fase 4 comienza en el momento en que reaparece la presencia del oxígeno, es necesario prevenir cualquier apertura a destiempo del contenedor, suelen ser causadas por roedores o insectos, las roturas de las

cubiertas deben ser reparadas inmediatamente. Para minimizar el deterioro durante el almacenaje, es preciso asegurar un silo hermético<sup>8</sup>.

### **Aditivos**

Se pueden emplear diferentes aditivos para acelerar el proceso como melaza, pulpa de cítricos y maíz triturado. Estos proveen una fuente de azúcares solubles que las BAL utilizan para producir ácido láctico. Si el forraje ensilado posee niveles de humedad superiores al 70%, los aditivos aseguran que el nivel de azúcares solubles sea suficiente para realizar el proceso. Ensilajes de maíz y de sorgo contienen suficiente cantidad de azúcares solubles y normalmente no requieren aditivos. Los forrajes que contienen pocos azúcares solubles para fermentar o un bajo contenido de materia seca no producen un ensilaje de buena calidad; por lo tanto, para inducir una buena fermentación es preciso aumentar el contenido de azúcares, ya sea agregándolos directamente como es el caso de la melaza o introduciendo enzimas que puedan liberar otro tipo de azúcares presentes en el forraje<sup>9</sup>.

Otro tipo de aditivos son los inóculos compuestos por bacterias vivas disponibles comercialmente, al agregar ciertas BAL pueden acelerar y mejorar el proceso del ensilaje. Se debe tener en cuenta que este tipo de microorganismos representa una porción muy pequeña de la filósfera de los cultivos forrajeros<sup>9</sup>.

### **Operacionalización del Evento de Estudio**

Es descrita por Palella y Martins como el proceso mediante el cual se determinan los indicadores del evento de estudio de una investigación con el fin de hacerlo observable y medible con cierta precisión<sup>40</sup>. En el presente trabajo se describe el evento de estudio mediante la operacionalización, con el fin de conocer los indicadores correspondientes (ver Tabla 2-4).

**Tabla 2. Operacionalización del Evento de Estudio *Lactobacillus* spp.**

1.Evento de estudio	2.Definición Conceptual ¿Qué es?	3.Definición operacional ¿Cómo se mide?
<i>Lactobacillus</i> spp.	BAL de la familia <i>Lactobacillaceae</i> , son Gram positivas y organismos no móviles. Los carbohidratos les resultan indispensables para su buen desarrollo, pues realizan la fermentación de las hexosas por la vía de la glucólisis Embden-Meyer, donde la glucosa se convierte en ácido láctico <sup>29</sup> .	Se miden mediante el aislamiento y la identificación <i>in vitro</i> de la especie de interés, a través de medios de cultivos específicos. En la identificación se usan criterios macroscópicos, microscópicos y bioquímicos, que consisten en la observación directa de las colonias, observación a través del microscopio y pruebas preliminares <sup>41-43</sup> . Otra de las técnicas utilizadas es el sistema API 50 CHL Medium, todas estas consideradas como métodos convencionales, existen también los no convencionales y moleculares usados para la identificación bacteriana <sup>10,27,44,45</sup> .
	4. Dimensiones	5. Indicador
	Presencia o ausencia del microorganismo <i>Lactobacillus</i> spp <sup>10</sup> .	Crecimiento en agar MRS Características de las colonias Cocobacilos Gram positivos Catalasa negativa Producción de ácido láctico positiva <sup>10,21</sup> .

**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

**Tabla 3. Operacionalización del Evento de Estudio las Comunidades Microbianas**

1.Evento de estudio	2.Definición Conceptual ¿Qué es?	3.Definición operacional ¿Cómo se mide?
Comunidades microbianas	Las comunidades microbianas consisten en poblaciones celulares integradas por diversas especies relacionadas entre sí capaces de desarrollar múltiples actividades funcionales, que les permite interactuar entre ellas y a su vez con el entorno biológico que las rodea <sup>3-6</sup>	Se miden mediante el aislamiento y la identificación <i>in vitro</i> de la especie de interés, a través del uso de medios de cultivo artificiales. Existen métodos convencionales y no convencionales para la identificación de los microorganismos, así también técnicas moleculares de gran interés que permiten el análisis de las secuencias de genes específicos e incluso de genomas completos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha tenido un nuevo alcance de la mano de la metagenómica <sup>3-6,46</sup>
	4. Dimensiones	5. Indicador
	Presencia o ausencia de los gremios o poblaciones microbianas <sup>5,45</sup> .	Crecimiento en medios artificiales selectivo-diferencial  Diversidad de morfotipos coloniales  Morfología puesta en evidencia a través de la coloración de Gram <sup>45</sup> .

**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

**Tabla 4. Operacionalización del Criterio de Análisis El Proceso de Ensilaje**

1.Criterio de Análisis	2.Definición Conceptual ¿Qué es?	3.Definición operacional ¿Cómo se mide?
Proceso de Ensilaje	Se basa en un principal fenómeno como lo es la fermentación de los carbohidratos solubles del forraje, por medio de BAL bajo condiciones de anaerobiosis, que conllevan a la acidificación del medio y esto a su vez a la conservación del alimento por la inhibición del desarrollo de mohos u otros organismos encargados de la putrefacción de dicho preparado <sup>7-9</sup> .	Se mide a través de los perfiles de fermentación y las características fisicoquímicas en relación con el tiempo. Los SCFAs, el ácido láctico, el etanol, el pH y la temperatura, son los principales analitos que definen este proceso <sup>46-47</sup> .
	<p data-bbox="598 1070 788 1102">4. Dimensiones</p> <p data-bbox="432 1249 954 1417">pH: desde 0 hasta 14 Temperatura: Los valores de temperatura fueron medidos en grados centígrados (°C)<sup>46</sup>.</p>	<p data-bbox="1102 1070 1246 1102">5. Indicador</p> <p data-bbox="981 1137 1370 1576">pH: Tiras indicadoras de pH con almohadillas reactivas que viran de color en respuesta los distintos grados de acidez Temperatura: Termómetro de mercurio, en el cual se visualiza el desplazamiento del líquido como indicador del aumento o disminución de la temperatura<sup>45</sup>.</p>

**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

## Objetivos de la Investigación

### Objetivo General

Comparar los cambios en la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp., asociados al proceso en los distintos silajes elaborados con *Ranunculus acris* (Botón de oro).

### Objetivos Específicos

- Detectar la presencia de microorganismos morfológicamente compatibles con BAL en los distintos silajes elaborados con *Ranunculus acris*.
- Detectar la presencia de otros microorganismos en los distintos silajes elaborados con *Ranunculus acris*.
- Evaluar las variaciones de pH y temperatura durante el proceso en los distintos silajes elaborados con *Ranunculus acris*.
- Clasificar las bacterias y hongos aislados del proceso en los distintos silajes elaborados con *Ranunculus acris*, según las características macroscópicas y microscópicas que poseen.
- Analizar los cambios en la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp., asociados al proceso en los distintos silajes elaborados con *Ranunculus acris*.
- Comparar los cambios en la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp., asociados al proceso en los distintos silajes elaborados con *Ranunculus acris*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Tipo de Investigación**

El tipo de investigación coincide con la profundidad, el alcance o el logro final del trabajo científico, por lo cual se corresponde de forma directa con el objetivo general del mismo<sup>16</sup>. El presente estudio tiene como logro comparar los cambios en la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp., asociados al proceso de ensilaje. Tomando como referencia lo antes expuesto, la presente investigación es de tipo comparativa.

### **Diseño de Investigación**

Los datos fueron recolectados considerando dónde, cuándo y la amplitud de la información<sup>16</sup>. En tal sentido, el diseño de esta investigación es de laboratorio ya que los datos se tomaron directamente de distintos silajes elaborados con *R. acris* y se procesaron en el Laboratorio Probiovital C.A. Es contemporáneo al haber realizado la colecta durante el desarrollo de la investigación. Finalmente, según la amplitud de la información es bivariable por abordar 2 eventos de estudio.

### **Población y Muestra**

### **Unidad de la Investigación**

El grupo de estudio está representado por *Ranunculus acris* es una hierba conocida como botón de oro, pertenece a la familia Ranunculaceae, de flores color amarillo con cinco pétalos y gran cantidad de estambres, es una planta silvestre bastante común, ha sido usada como forraje para ensilajes en la alimentación de distintos animales. Se incluyeron en el estudio pequeños

segmentos de *R. acris*, los cuales fueron utilizados para la elaboración de silajes, a partir de estos se tomaron las muestras en las diferentes etapas del proceso de fermentación para la detección de diversos microorganismos<sup>9</sup>.

### **Selección del Tamaño de la Muestra**

La muestra y los datos se obtuvieron a partir de distintos silajes de *R. acris*, en el tiempo expuesto a continuación: día 0, día 4, día 7, día 14 y día 21. Fueron medidas las características físicas del ensilaje, se detectaron y caracterizaron las comunidades microbianas de interés.

### **Sistema de Variables**

El presente trabajo no está sistematizado a través de variables dependientes e independientes, ya que el tipo de investigación comparativa no corresponde con este sistema.

### **Procedimientos de la Investigación**

#### **Elaboración de Silajes**

Se elaboraron a partir de pequeños fragmentos de *R. acris*, la planta fue cortada y llevada al laboratorio, los envases fueron rotulados con la numeración: 1.1; 1.2; 1.3; 1.4; 1.5, correspondientes a los silajes que solo contendrían porciones de *R. acis*, representan el tratamiento 1 (T1); 2.1; 2.2; 2.3; 2.4; 2.5, los contentivos de *R. acis* más papelón derretido como un aditivo que proporcionó fuentes de carbono de primera mano tratamiento 2 (T2), finalmente 3.1; 3.2; 3.3; 3.4; 3.5, para los preparados con la mezcla anterior adicionándole un inóculo comercial de lactobacilos tratamiento 3 (T3). Se

introdujo el material pertinente dentro de cada recipiente, dejando la menor cantidad de oxígeno disponible para el proceso de fermentación<sup>46</sup>.

### **Recolección de las Muestras**

Para la recolección se diseñó un protocolo de trabajo, en el cual se describe los pasos que se siguieron:

1. Material necesario para la recolección de las muestras: medios de cultivos MRS, Saboraud dextrosa (SD) y agua peptonada (AP) ya preparados y esterilizados, material de vidrio y plástico esterilizado, otros materiales como balanza, termómetro, tiras de pH y pinza metálica, silajes correspondientes para el día de muestreo, uno de cada tipo ejemplo 1.1; 2.1 y 3.1; rotular el material a utilizar<sup>47</sup>.
2. Se procedió a destapar los silajes e introducir el termómetro durante 5 min, anotar el valor reflejado, se tomó una porción de 10gr de materia vegetal de distintas profundidades del envase, se traspasó a un recipiente con 90mL de AP para una solución de 1:10 denominada -1, de igual forma se procedió con los 2 silajes restantes, las mezclas se agitaron durante 5 min y se dejaron reposar 30 min. A continuación, para medir el pH se introdujo la tira dentro de la dilución y se leyó comparado los colores de las almohadillas, se registró la cifra de cada caso<sup>47</sup>.
3. En microtubos eppendorf se dispensó 900  $\mu$ L de AP, para la preparación de las diluciones 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50 nombradas -2, -3, -4 y -5 respectivamente. En la primera de ellas (-2) se contuvo 100  $\mu$ L de muestra proveniente del preparado anterior, se mezcló y se trasvasó 100  $\mu$ L al siguiente contenedor (-3), se repitió el mismo procedimiento con las diluciones restantes de cada una de las muestras de los silajes. Fueron seleccionadas las suspensiones -3, -4 y -5 de cada caso para la siembra en los agares<sup>47</sup>.
4. En los medios MRS y SD fue dispensado 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones seleccionadas, cada una por separado y con ayuda de varillas

de vidrio se dispersó el líquido. Luego fueron llevados a la estufa en microaerobiosis los medios MRS a 37°C y SD al contrario en aerobiosis a temperatura ambiente para su incubación durante 48 horas<sup>47</sup>.

### **Detección y Caracterización de las Comunidades Microbianas**

Al finalizar el período de incubación, fueron revisados cada uno de los medios inoculados, se registraron las características de los tipos de colonias observadas y la cantidad. En continuación con lo anterior se realizó la coloración de Gram para los distintos morfotipos coloniales presentes en el agar MRS. Las comunidades microbianas encontradas en el agar SD fueron contadas según el número de colonias presentes en el medio y puestas en evidencia a través de un examen directo con lugol. Luego de transcurrido el tiempo pertinente se realizó la identificación de las colonias fúngicas que se desarrollaron posterior a las 48 horas de incubación en SD, basándose en sus propiedades macroscópica y microscópicas<sup>32,47,48</sup>.

### **Diseño de Análisis de los Datos**

El diseño de análisis tuvo un enfoque cuantitativo utilizando la estadística descriptiva, en tal sentido dicha información fue medida numéricamente; los resultados se expresaron en tablas, gráficos de barra y otros, que a su vez permitieron el análisis e interpretación de los mismos, estas técnicas estadísticas responden a distintos niveles de medición<sup>40</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados

#### Detección de microorganismos morfológicamente compatibles con BAL

La presencia de BAL en relación con el tiempo de ensilaje presentó escasas cantidades en el inicio de los días, resaltando los silajes con el T1, en los cuales no hubo crecimiento hasta el día 14, por el contrario, en aquellos que fueron inoculados con el T3, se detectaron un alto nivel de estos microorganismos como reseña la Tabla 5, contrastando UFC obtenidas los días 0, 4, 7, 14 y 21, de los distintos silajes. Los mayores valores corresponden para los días 14 y 21 de los T2 y T3.

**Tabla 5. BAL detectadas en agar MRS relacionadas con el tiempo de ensilaje**

	Días	0	4	7	14	21
UFC	<b>Silajes T1</b>	0	0	0	1 x10 <sup>5</sup>	1 x10 <sup>6</sup>
	<b>Silajes T2</b>	0	5 x10 <sup>6</sup>	4,5 x10 <sup>6</sup>	1 x10 <sup>7</sup>	1,34 x10 <sup>7</sup>
	<b>Silajes T3</b>	0	3 x10 <sup>7</sup>	3,2 x10 <sup>6</sup>	1,36 x10 <sup>7</sup>	2 x10 <sup>7</sup>

**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

#### Detección de microorganismos morfológicamente compatibles con especies fúngicas

En la Tabla 6 se describe la cantidad de colonias contadas que morfológicamente fueron identificadas como organismos fúngicos en relación con el proceso de ensilaje, el más alto número obtenido corresponde al silaje T2 en el día 7, sin embargo, en el transcurso del tiempo fue el T1 quien presentó la mayor cantidad de colonias, por el contrario, el T3 tuvo los valores más bajos y continuaron disminuyendo con el paso de los días.

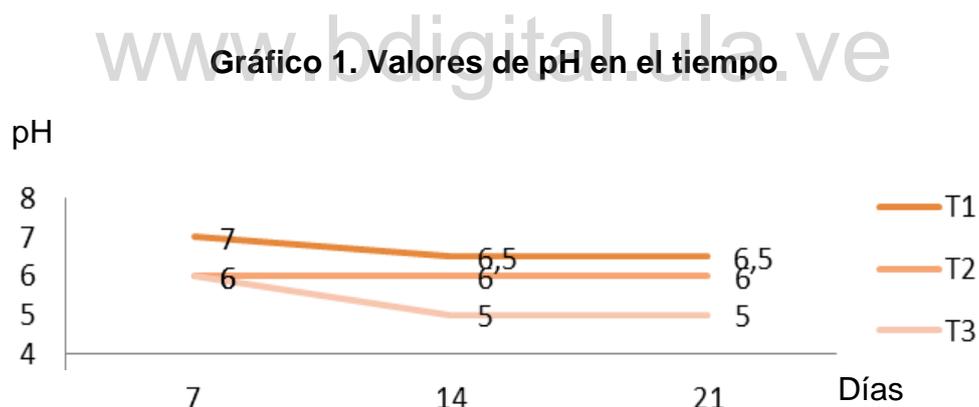
**Tabla 6. Organismos fúngicos detectados en agar SD relacionados con el tiempo de ensilaje**

N° de colonias	Días	0	4	7	14	21
	<b>Silajes T1</b>		0	1	5	4
<b>Silajes T2</b>		0	0	6	1	0
<b>Silajes T3</b>		1	4	2	0	0

**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

### Detección de pH y temperatura

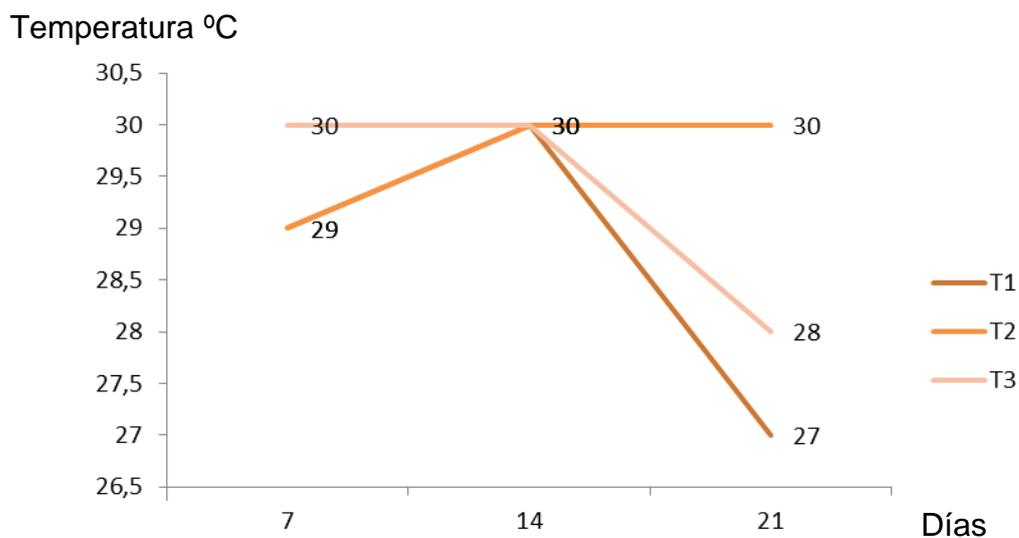
Los valores de pH obtenidos registraron su mayor concentración en el día 7 para los 3 tratamientos, progresivamente fueron disminuyendo con el paso del tiempo como refleja el Gráfico 1, los menores valores de pH se obtuvieron del T3.



**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

En cuanto a los registros de temperatura arrojaron valores semejantes entre los distintos tratamientos en el día 7, luego comenzaron a descender en el transcurso del tiempo, excepto el silaje T2 que aumento su valor, la menor temperatura fue alcanzada por el silaje T1 en el día 21 del proceso de ensilaje (ver Gráfico 2).

**Gráfico 2. Valores de temperatura °C en el tiempo**

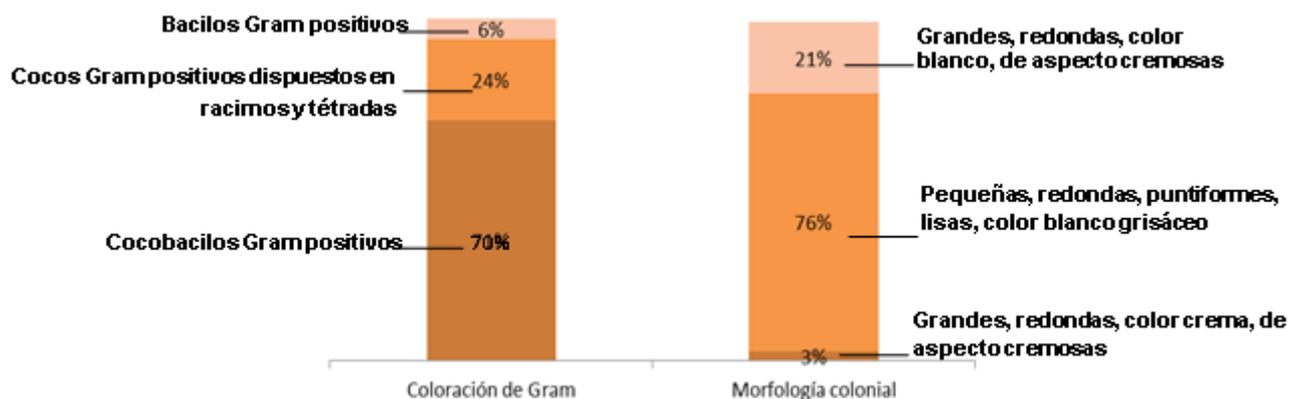


**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

### **Clasificación de BAL y hongos según las características macroscópicas y microscópicas**

Las BAL presentes en el agar MRS se clasificaron en 3 tipos de morfología colonial como refleja el Gráfico 3, entre estas la de mayor porcentaje se describió como: Pequeñas, redondas, puntiformes, lisas, color blanco grisáceo. Así también se hizo referencia a la morfología hallada en la coloración de Gram, siendo la proporción más significativa la correspondiente a: Cocobacilos Gram positivos.

**Gráfico 3. Proporciones correspondientes a morfología colonial y morfología hallada según la coloración de Gram en BAL presentes en el agar MRS**



**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

Las colonias fúngicas presentes en el agar SD fueron clasificadas según sus características morfológicas macro y microscópicas, obteniendo que la especie *Hormodendrum* sp., fue la más frecuente durante el proceso de ensilaje, su descripción está representada en la Tabla 7, le sigue la especie *Aspergillus niger* representando el 20,8% y posteriormente el único hongo de tipo levadura detectado *Candida* sp., de las 34 colonias totales correspondió para el 16,7%.

**Tabla 7. Clasificación morfológica y proporción de los organismos fúngicos detectados en SD**

Morfología colonial	Morfología observada al examen directo con azul de lactofenol (posterior a las 48 horas)	Identificación micológica	Nº de colonias	%
Exopigmento color marrón, aspecto aterciopelado, velocidad de crecimiento moderado	Macroconidias e hifas	<i>Hormodendrum</i> sp.	14	58,3%
Exopigmento color verde oliva y blanco, aspecto aterciopelado, velocidad de crecimiento moderado	Conidias e hifas hialinas especializadas (conidiófora)	<i>Penicillium</i> sp.	1	4,2%
Exopigmento color negro y marrón, aspecto granuloso, velocidad de crecimiento abundante	Conidias (feosporas), hifas especializadas (conidiófora), hongo dematiáceo	<i>Aspergillus niger</i>	5	20,8%
Grande, amorfa, de bordes irregulares, color blanco, de aspecto cremoso	Blastoconidias, levaduras aisladas y pseudohifas	<i>Candida</i> sp.	4	16,7%
		Total	12	100,0%

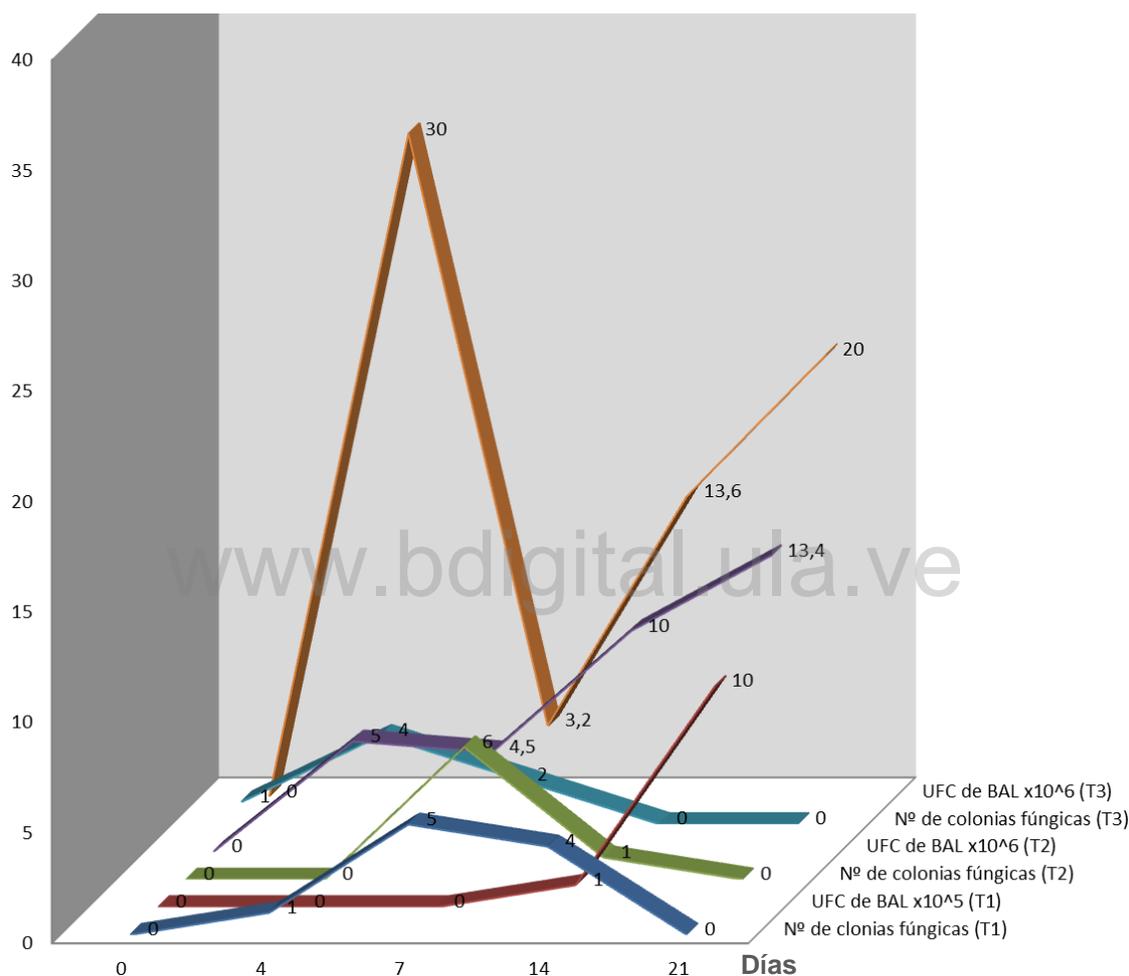
Fuente: Prieto y Jiménez, 2023.

### **Cambios en la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp., en el tiempo**

En el Gráfico 4 se confrontan las variaciones respecto a la cantidad de BAL en UFC y el número de colonias fúngicas detectadas durante los 21 días de ensilaje por cada tratamiento, a partir de lo cual es importante resaltar que desde el día 7 hubo un crecimiento exponencial para las BAL en todos los

silajes con un mayor valor alcanzado por el T3 en el día 4 y 21, en contra parte desde el mismo día 7, comenzaron a disminuir los valores de las comunidades de hongos, e incluso en el último muestreo no hubo crecimiento.

**Gráfico 4. Cambios en las comunidades microbianas en relación con el tiempo del ensilaje**



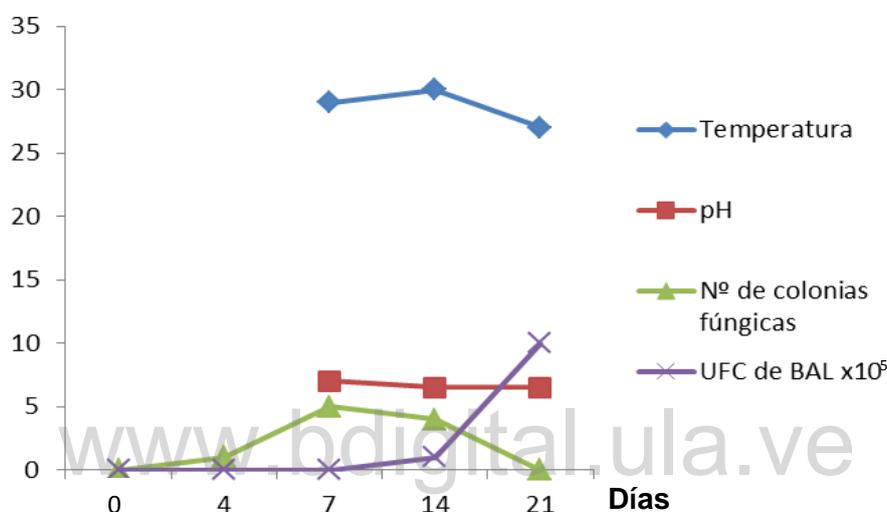
Fuente: Prieto y Jiménez, 2023.

### Cambios en la composición de las comunidades microbianas y el proceso de ensilaje

Para el silaje T1 los cambios más resaltantes consistieron en un aumento en el recuento de organismos fúngicos, el mayor valor fue de 5 colonias correspondiente para el día 7, estas cifras continuaron descendiendo con la

sucesión del tiempo. Las concentraciones de BAL se detectaron a partir del día 14 con bajos números su mayor contaje fue registrado el último día. Por otra parte, el pH inicio en un valor de 7 y finalizó con su menor valor de 6,5. La temperatura obtuvo cifras altas y bajas, cayendo a 27 °C el día 21 (ver Gráfico 5).

**Gráfico 5. Variaciones en las comunidades microbianas asociadas al proceso de ensilaje en T1**



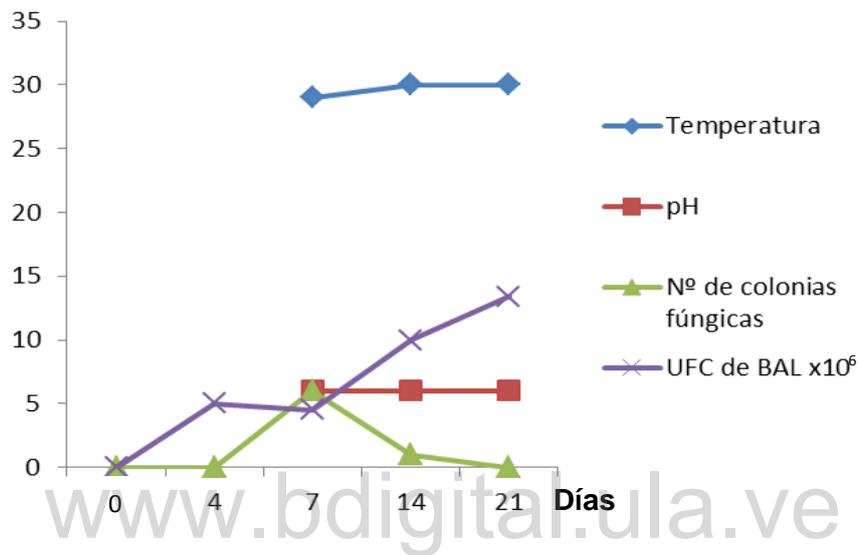
**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

Las variaciones que se presentaron en el silaje con el T2, son más favorables en cuanto a la cantidad de UFC de BAL, iniciando el día 4 con 5 x 10<sup>6</sup> UFC, este comportamiento continuo en aumento, logrando un máximo de 13,4 x 10<sup>6</sup> para la recolección del día 21. En el caso contrario para las colonias de hongos, el escaso contaje obtenido en la tercera apertura del silaje de valor 7, fue disminuyendo con el paso del tiempo hasta no registrar valor alguno. El pH y la temperatura permanecieron estables durante el proceso, con medias de 6 para el pH y de 29,7 °C (ver Gráfico 6).

En el Gráfico 7 están representadas las variaciones propias del silaje T3, siendo el que reportó los más altos niveles de UFC de BAL en el día 4 y 21. Presentó cantidades exiguas de organismos fúngicos, con un máximo de 4

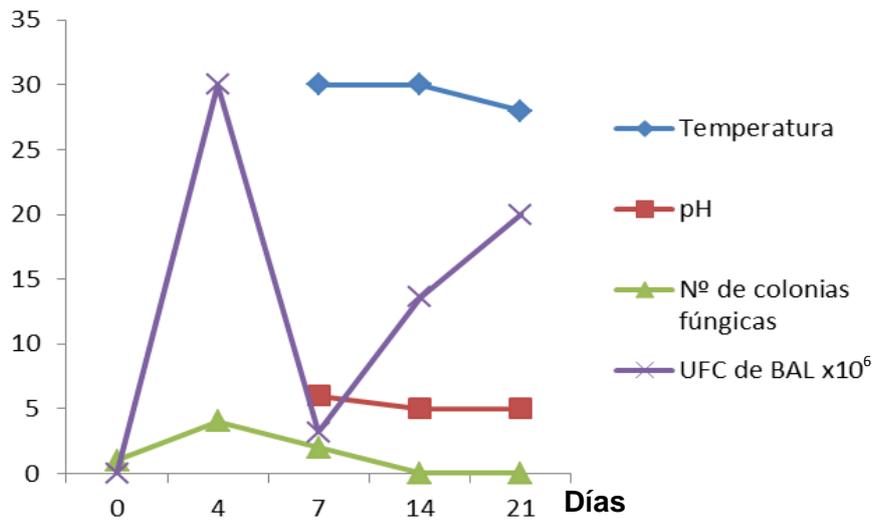
colonias el día 4. Por su parte el pH descendió desde el día 7 hasta la última recolección, resultando en un valor de 5. La temperatura se comportó de manera similar registró una baja de 28 °C en el final del proceso de recolección de las muestras.

**Gráfico 6. Variaciones en las comunidades microbianas asociadas al proceso de ensilaje en T2**



**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

**Gráfico 7. Variaciones en las comunidades microbianas asociadas al proceso de ensilaje en T3**



**Fuente:** Prieto y Jiménez, 2023.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Discusión

La primera muestra recolectada directamente de la superficie de la planta mostró que las concentraciones iniciales de BAL son escasas, es decir solo representa un pequeño porcentaje en la filósfera del forraje, este hecho concuerda con los resultados obtenidos en los primeros días, donde es de resaltar el comportamiento presentado por el silaje T1 sin inoculantes, ni aditivos, en el cual no hubo crecimiento evidente después de 48 horas de incubación de BAL, conducta que se repitió los días 0 y 4 del ensilaje. Los autores Drouin, Tremblay y Chaucheyras-Durand, en similitud a lo expuesto anteriormente mencionan en sus resultados, al orden Lactobacillales como representantes apenas del 3,2% de la población total en las muestras frescas<sup>46</sup>. Dicho fenómeno puede deberse a las condiciones ambientales, factores bióticos y abióticos a los cuales están expuestos las distintas plantas y con ellas su característico microbioma, quienes son modificados constantemente por estos elementos<sup>3-6,11</sup>.

Durante el proceso de ensilaje la sucesión de los cambios en la población de BAL mostró un aumento exponencial luego del día 7, en especial los silajes T3 con inoculante, quienes obtuvieron los mayores valores  $3,2 \times 10^6$ ;  $1,36 \times 10^7$ ;  $2 \times 10^7$  UFC para los días 7, 14 y 21 respectivamente, así también pero en menor escala T2 contentivo solo de aditivos de papelón, mostró elevación significativa durante el corto periodo de tiempo, finalmente el T1 tuvo ausencias en su crecimiento hasta el día 14 con  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  UFC en el día 21, muy por debajo de lo descrito en los silajes anteriores. Es importante señalar que Drouin y cols, tras realizar el muestreo de los días 1, 2, 4, 8 y 16 demostraron similitud al exponer sus resultados, dividieron este proceso en dos fases, la primera englobó los días 1 y 2 donde los porcentajes correspondientes para las BAL continuaron siendo bajos, aunque superiores a los iniciales, posterior a ello en la fase 2 (días 4, 8 y 16) las proporciones alcanzaron hasta un máximo de 56.1% de BAL (día 16) perteneciente a los silajes inoculados con LH. También se halló semejanza al comparar los ensilajes del control de la mencionada publicación, los mismos tenían porcentajes inferiores aun después

de 16 días de fermentación con apenas un 8.3% de BAL, esta conducta se mantuvo durante los periodos sucesivos, a pesar de que continuaron elevándose, los niveles de concentración no fueron tan significativos como los obtenidos por los silajes con inoculantes<sup>46</sup>.

En este orden de ideas se pueden hacer inferencias sobre las razones que expliquen los comportamientos de los distintos silajes en el transcurso del tiempo y su influencia sobre las BAL; como se ha referido ya en la teoría de los capítulos anteriores, al iniciar el proceso de ensilaje los microorganismos aeróbicos y la planta forrajera consumen el oxígeno del medio hasta casi agotarlo, por lo cual generan las condiciones adecuadas para el crecimiento de los autores del proceso de fermentación las BAL, quienes a pesar de conformar un reducido porcentaje del microbioma, se abren paso entre las comunidades colindantes para convertirse en la familia dominante; claro está el hecho de que al añadir inoculantes al silaje, estos microorganismos también se multiplican en razón de subsistir en este entorno y aceleran la fermentación del ensilaje al encontrarse en mayores cantidades<sup>5,7-9</sup>.

Continuando con el resto de las poblaciones microbianas en especial el comportamiento de los organismos fúngicos, fueron destacados los silajes T1 con la mayor cantidad de colonias y en contraposición los silajes T3 con el menor número hallado; en el transcurrir del tiempo los valores disminuyeron hasta el día 21, para el cual no se observó crecimiento luego de una semana de incubación. En la clasificación e identificación de los hongos fue *Hormodendrum* sp., quien se presentó con más frecuencia 58,3%; otros como *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* y *Candida* sp., tuvieron porcentajes inferiores. En la investigación realizada por Mionetto los principales géneros encontrados fueron *Penicillium* y *Aspergillus*, puede deberse a que usaron sorgo como forraje en la elaboración de los silajes<sup>47</sup>. Por su parte Drouin y cols, hallaron un aumento en la población de levaduras, entre los cuales destacan *Candida*, *Dipodasco*, o *Hannaella* y su abundancia se extendió hasta un 45% del total de unidades taxonómicas observadas (OTU). Posteriormente y en convergencia con la presente investigación, la población de levaduras disminuyó en todos los tratamientos a excepción del control, este mantuvo los valores más elevados

hasta que en el día 32, representó solo una proporción baja de 8.2%, en los demás tratamientos estuvo muy por debajo de esa cifra<sup>46</sup>.

En el análisis de los detalles expuestos es oportuno mencionar que, la inoculación con BAL es un factor determinante para la estabilidad aeróbica del ensilaje al reducir la masa de organismos fúngicos, sobre lo cual muchos autores aportan puede ser la consecuencia del efecto antagónico, derivado de los metabolitos acumulados en el medio, los mismos son producidos por bacterias fermentadoras, en especial se ha estudiado los ácidos tales como el propionato, el acetato o el lactato y su incidencia negativa sobre la tasa de crecimiento de las levaduras, todo esto indicaría que al aumentar las concentraciones de BAL y estas liberen mayores cantidades de sustancias en el entorno, conllevará a una fase de quiescencia celular o detención temporal de la multiplicación de otros organismos y entre ellos los hongos y bacterias cercanos<sup>12,13,46,47</sup>.

Los valores de pH registrados a partir del día 7 mostraron cifras elevadas de 7, 6 y 6, para los tratamientos T1, T2 y T3 respectivamente, Drouin y cols, obtuvieron un gran descenso después del primer día con una media entre los distintos silajes de 5.01 (primer día) y 4.24 (segundo día), posterior a los 8 días, la media continuó disminuyendo hasta alcanzar 3.77<sup>46</sup>. Por el contrario, en los resultados hallados el valor más bajo fue de 5, presentándose en dos ocasiones por el T3 en los días 14 y 21. Ante las divergencias expuestas con respecto a las variaciones de pH asociadas al tiempo de ensilaje en un corto periodo, se puede hacer inferencia de que posiblemente el uso de una planta no común para forrajes como lo es *R. acris* haya ocasionado el alto índice del pH. Otras de las razones con la cual se puede explicar dicha disyuntiva es la pequeña proporción que representan las BAL en la filósfera inicial, pudiesen ser incapaces de virar las condiciones de acidez en tan pocos días; en las distintas publicaciones la unidad de investigación ha consistido en *Zea mays* (Maíz) en su mayoría y sorgo húmedo, quienes en concordancia con Drouin y cols, demostraron cifras de pH por debajo de 5<sup>46,47</sup>. A su vez luego de analizar y comparar con el resto de los silajes también es de mencionar la importancia de inocular con probióticos el forraje a ensilar, estos por su producción de

ácidos derivados del metabolismo (fermentación), inducirán de forma más rápida las condiciones de acidez necesarias para la preservación de la materia vegetal o algún aditivo que provea una fuente de azúcares solubles y sirva como sustrato para las BAL<sup>9</sup>.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

1. Se demostró la presencia de microorganismos morfológicamente compatibles con BAL en los distintos silajes elaborados con *R. acris*, las mayores concentraciones se correspondieron para T2 y T3, con un crecimiento exponencial luego del día 7.
2. Solo se evidenció la presencia de organismos fúngicos en los distintos silajes elaborados con *R. acris*, el conteo de colonias fue disminuyendo con el paso del tiempo, el silaje T1 obtuvo el mayor número de colonias.
3. Se verificaron las variaciones de pH y temperatura durante el proceso en los distintos silajes elaborados con *R. acris*, aunque los niveles alcanzados por ambas no son concluyentes, razonando en que el tipo de forraje pudo influir en el proceso de fermentación, mas sin embargo de manera efectiva y a pesar de los elevados niveles de pH, la conservación del material vegetal fue notoria en todos los tratamientos.
4. Se clasificaron las bacterias y hongos aislados de los distintos silajes a partir de *R. acris*, según las características macroscópicas y microscópicas correspondientes, para la población bacteriana la mayoría fueron clasificadas conforme a los criterios de BAL, por su parte el 58,3% de las colonias fúngicas se identificaron dentro del género *Hormodendrum* sp.
5. En el análisis de los cambios en la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp., asociados al proceso los distintos silajes elaborados con *R. acris*, se debe mencionar que la presencia de BAL como organismos epífitos o inoculados, es esencial para el desarrollo del proceso de fermentación y posterior conservación del ensilaje.
6. Al comparar los cambios en la composición de las comunidades microbianas y la presencia de *Lactobacillus* spp., asociados al proceso en los distintos silajes elaborados con *R. acris*, se puede describir que

en la primera fase aeróbica, la población de BAL mantuvo bajas concentraciones, los contajes de colonias fúngicas fueron escasos y las medidas de pH altas, luego en la fase 2 de fermentación hubo un aumento exponencial de las UFC de BAL, esto condujo al descenso en los valores de pH y el mantenimiento de cantidades exiguas de colonias de hongos.

7. La utilización de aditivos e inoculantes aumentó las concentraciones de BAL en menor cantidad de tiempo, mejoró las condiciones de calidad del ensilaje y se asoció con la reducción de colonias fúngicas.

### **Recomendaciones**

1. Es pertinente para mejorar la calidad del ensilaje el uso de aditivos e inoculantes, esto asegurará la preservación de la planta con el fin último de poder alimentar el ganado en los tiempos de escases de pastos.
2. El uso de *R. acris* como forraje puede ser viable, pero para garantizar que ocurra el proceso de ensilaje adecuado se sugiere añadir aditivos e inoculantes.
3. Realizar otras investigaciones sobre el uso de *R. acris* como planta forrajera, y su influencia sobre la composición microbiana durante el proceso de ensilaje, puesto que es un recurso de mucha disponibilidad, con potencial alimenticio para el ganado a través del ensilaje.
4. Uso de nuevas tecnologías para mejorar la comprensión del comportamiento de los microbiomas, sus interacciones y cambios a propósitos de la modificación del ambiente donde se encuentran.
5. Es recomendable llevar a cabo la sucesión de los cambios en las comunidades microbianas y el perfil de fermentación en el proceso de ensilaje, durante un tiempo más prolongado de manera en que se puedan percibir todas las etapas que integran dicho proceso.

## Referencias Bibliohemerográficas

1. Alvarado C, Díaz C. Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Revista Facultad de Farmacia*. 2009; 51 (1). (22 de Noviembre de 2022).
2. Garcia A, Henríquez P, Retamal C, Pineda S, Delgado C, y Gonzalez C. Propiedades probióticas de *Lactobacillus* spp aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Med Chile*. 2009; 37: 369-376. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v137n3/art07.pdf> (22 de Noviembre de 2022).
3. Domínguez L, Orijel C, Poggi-Varaldo H, García J. Caracterización de las comunidades microbianas útiles en biorremediación y producción de probióticos por su huella genética. *Rev Latinoam Microbiol* 2006; 48 (2): 211-225. <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062w.pdf> (último acceso 4 de Junio de 2023).
4. Díaz G, Wachter C. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev Latinoam Microbiol* 2003; 45 (1-2): 30-40. [https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2003/mi03-1\\_2e.pdf](https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2003/mi03-1_2e.pdf) (último acceso 4 de Junio de 2023).
5. De la Cruz M, Zamudio M, Corona A, González J, Rojas R. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recur. agropecuarios* 2015; 2(4):99-115. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-90282015000100008&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282015000100008&lng=es). (último acceso 4 de Junio de 2023).
6. Nieva A. Estudio de la biodiversidad microbiana asociada con áreas edáficas marginales para la agricultura en la Pampa Deprimida (Buenos Aires, Argentina), bajo la influencia del monocultivo de *Lotus tenuis*. Análisis de la interacción entre *Lotus* spp. y *Fusarium solani* en el *continuum* mutualismo-patogénesis. Tesis doctoral. Universidad Nacional de San Martín; 2018. [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/94152/CONICET\\_Digital\\_Nro.769d0dab-a55a-40a2-b536-da61d5919871\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/94152/CONICET_Digital_Nro.769d0dab-a55a-40a2-b536-da61d5919871_A.pdf?sequence=2&isAllowed) (último acceso 4 de Junio de 2023).
7. Ruiz M, Colello R, Padola N, Etcheverría A. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp, sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Rev Argent Microbiol*. 2017; 49 (2):174-177. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/1CFF0DA89EFE232D050EDBAA94933548AEFBC28137693DA4FA95DA3FAFDA04FF149085B081AD710225E4BAE81012E72E> (último acceso 22 de Noviembre de 2022).
8. Oude Elferink S, Driehuis F, Gottshal J, Spoelstra S. Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre el Ensilaje en los Trópicos. 1999. [https://www.researchgate.net/publication/281275854\\_Los\\_procesos\\_de\\_fermentacion\\_del\\_ensilaje\\_y\\_su\\_manipulacion](https://www.researchgate.net/publication/281275854_Los_procesos_de_fermentacion_del_ensilaje_y_su_manipulacion) (último acceso 1 de mayo de 2023).

9. Garcés M, Berrio L, Ruíz S, Serna J, Builes A. Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista Lasallista de Investigación*. 2004 Junio. 1(1):66-71. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69511010> (último acceso 1 de Junio de 2023).
10. Sánchez L, Vichi J, Llanes M, Castro E, Soler D, Espinosa I, Kociubinski G, Ferreira C. Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas *Lactobacillus* spp, como candidato a probiótico. *Salud Anim*. 2011; 33 (3) <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v33n3/rsa03311.pdf> (último acceso 22 de Noviembre de 2022).
11. Gaube P, Junker R, Keller A. Cambios en medio de la constancia: microbiomas de flores y hojas a lo largo de gradientes de uso de la tierra y entre biorregiones. 2021 Febrero. 50:1-15. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2020.10.003>. Elsevier.
12. Luna N. Inhibición del crecimiento de levaduras tolerantes a ácidos por acetato, lactato y propionato y sus mezclas sinérgicas. 1983 Diciembre; 55(3):453-460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb01685.x> Revista de Bacteriología Aplicada.
13. Arriola K, Oliveira A, Jiang Y, Ferraretto L, Vyas D y Adesogan A. Metanálisis de los efectos de la inoculación con *Lactobacillus buchneri*, con o sin otras bacterias, en fermentación de ensilaje, estabilidad aeróbica y rendimiento de vacas lecheras. 2021 Julio; 104(7). DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19647> Journal of Dairy Science.
14. Da Silva É, Costa D, Santos E, Moyer K, Hellings E, Kung L. Los efectos de *Lactobacillus hilgardii* 4785 y *Lactobacillus buchneri* 40788 sobre el microbioma, la fermentación y la estabilidad aeróbica del ensilaje de maíz ensilado varias veces. 2021 Julio; 104(10). DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20111> Journal of Dairy Science.
15. Arteaga F, Laurencio M, Rondón A, Milián G y Bococurt R. Aislamiento, selección e identificación de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico tecnológico del tracto digestivo de pollos de traspatio. *RSVM*. 2018; 38: 15-20. [https://190.169.30.98/ojs/index.php/rev\\_vm/article/download/16050/144814482634](https://190.169.30.98/ojs/index.php/rev_vm/article/download/16050/144814482634) (último acceso 25 de Noviembre de 2022).
16. Hurtado J. *El proyecto de la investigación*. 7ª ed. Caracas: FEDUPEL; 2010.
17. Ruiz B, Castillo Y, Anchondo A, Rodríguez C, Beltrán R, La O O, Payán J. Efectos de enzimas e inoculantes sobre la composición del ensilaje de maíz. *Archivos de Zootecnia*. 2009; 58 (222), Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49515286001> (último acceso 25 de Noviembre de 2022).
18. Villa R, Hurtado J. Evaluación nutricional de diferentes ensilajes para alimentar conejos. *Rev. Cienc. Agr*. 2016; 33(2):76 - 83. doi: <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.163302.54> (último acceso 14 de Junio de 2023).
19. González T. Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. *SEM@FORO*. 2012; 53 (3). <https://es.scribd.com/document/354510156/Microbiologia-Industrial> (último acceso 25 de Noviembre de 2022).

20. Alegría J. Importancia de la Biotecnología Microbiana: Bioinformática. *Conacyt*. El Salvador; 2012. [http://www.redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/2581/1/120307%20RA142%20UES%20Imp%20Biotec%20Microbiana\\_Bioinformatica.pdf](http://www.redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/2581/1/120307%20RA142%20UES%20Imp%20Biotec%20Microbiana_Bioinformatica.pdf) (último acceso 25 de Noviembre 2022).
21. De Montijo S. Estudio del potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* C4. Tesis doctoral. Universidad de Granada; 2017. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=136142> (último acceso 22 noviembre 2022).
22. Hernandez R, Fernández C, Batista L. *Metodología de la Investigación*. 5ª ed. México: Mc Graw Hill; 2010.
23. Mendoza S. Historia de la microbiología de los alimentos y su desarrollo en Latino América. *Revista de investigación UNMSM*. 2014. 5(2). Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3409/2826>. (último acceso 25 de Noviembre de 2022).
24. Collard P. *El desarrollo de la Microbiología*. 1ª ed. España: Reverté; 1985.
25. Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al. Definición de microbioma revisada: viejos conceptos y nuevos desafíos. *Microbiome*. 2020; 8(103). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0> (último acceso 14 de Junio de 2023).
26. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología Médica*. 6ª ed. España: Elsevier; 2009.
27. Ortiz M. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2006. <http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10741/Identificacionbioquimicapdf?sequence=1> (último acceso 24 de Noviembre de 2022).
28. González F, González B. Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolemicos. *Salus cum propositum vitae*. 2006; 7 (1): 75-81. <http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/162/144> (último acceso 23 de Noviembre de 2022).
29. Samaniego L, Sosa M. *Lactobacillus* spp: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Matanzas, Cuba: Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"; 2009. <https://monografias.umcc.cu/monos/2001/mono11.pdf> (último acceso 25 de Noviembre de 2022).
30. Cabeza E. Bacterias ácido-lácticas, aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. España: Universidad de León; 2012. <http://docplayer.es/48629557-Bacterias-acido-lacticas-bal-aplicaciones-como-cultivos-estarter-para-la-industria-lactea-y-rnica1.html> (último acceso 24 de Noviembre 2022).
31. Seijas J. Biodiversidad de bacterias ácido lácticas asociada a la variedad Albariño (*Vitis vinífera* L.) cultivada en Val do Salnés. Estudio de sus aplicaciones. Tesis doctoral. Universidad de Vigo; 2017.
32. Moreno L. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus sp* con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Tesis de Postgrado. Universidad

- Nacional de Colombia; 2012.  
<http://bdigital.unal.edu.co/8647/1/lizethjohannamorenogalarza.2012.pdf>  
 (último acceso 24 de Noviembre de 2022).
33. Díaz OH. Estudio de la biocorrosión utilizando técnicas electroquímicas de bajo campo. Tesis de grado. Universidad Nacional Autónoma de México. 2012.  
<http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/5025/Tesis.pdf?sequence=1> (último acceso 25 de Noviembre de 2022).
  34. Karpyuk V, Yuzkiv S, Zhurahivska L, Konechny Y, Konechna R. Revision tall buttercup (*Ranunculus acris* L.): Revisión analítica de distribución, composición química, actividad biológica y aplicación médica. *Revista farmacéutica*. 2021; (3). DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2021.3.12476> (último acceso 10 de Junio de 2023).
  35. Deghima A, Ansorena D, Calvo M, Astiasarán I, Bedjou F. Constituyentes nutricionales y efecto de la digestión in vitro sobre los polifenoles y la actividad antioxidante del botón de oro de hoja grande (*Ranunculus macrophyllus* Desf.). *Biociencia alimentaria*. 2021 Abril; 40. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100904> (último acceso 10 de Junio de 2023).
  36. Moges E, Balakrishnan M. Composición nutricional de las plantas alimenticias de Geladas (*Thepithecus gelada*) en el área protegida de la comunidad de Guassa, Etiopía. *Diario de Biología, Agricultura y Salud*. 2014; 4(23). <https://www.iiste.org/vol-4-no-23-no-24-2014-journal-of-biology-agriculture-and-healthcare/> (último acceso 10 de Junio de 2023).
  37. Camacho R, Meneses M. Comparación de dietas alimenticias para pollos de engorde en el Municipio de Solita, Caquetá. Tesis de grado. Universidad nacional abierta y a distancia; 2018.
  38. García R. Composición química y valor nutritivo de los henos y de las especies más representativas en los prados de montaña de león. Evolución en tres sistemas de manejo y notas sobre su estado fenológico. Universidad de León. 2018. <http://hdl.handle.net/10261/162800> (último acceso 14 de Junio de 2023).
  39. Cevallos DA. Utilización de ensilaje de residuos agroindustriales y biológicamente acelerado en la alimentación de terneros de levante. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2005 <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1817/1/17T0716.pdf> (último acceso 22 noviembre 2022).
  40. Palella S, Martins F. *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. 2ª ed. Caracas: FEDUPEL; 2010.
  41. Rodríguez, C. Evelyn, Gamboa, C Maria del mar. Hernandez, C. Fransisco. Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. 2da, Ed. Editorial Universidad de Costa Rica. 2016. <http://www.editorial.ucr.ac.cr/ciencias-naturales-y-exactas/item/1663-bacteriologia-general-principios-y-practicas-de-laboratorio-2a-ed.html> (último acceso 22 de Noviembre de 2022).
  42. Mansilla, C. Guía de laboratorio de Microbiología Básica. Catedra de Microbiología Universidad Nacional del Rosario. 2018.

43. BioMérieux® SA. api® 50 CHL Medium. Abstracto [consultado]: 24 de Noviembre 2019. [https://www.mediray.co.nz/media/15797/om\\_biomerieux\\_test-kits\\_ot-50410\\_package\\_insert-50410.pdf](https://www.mediray.co.nz/media/15797/om_biomerieux_test-kits_ot-50410_package_insert-50410.pdf) (último acceso 24 de Noviembre de 2022).
44. Solís R. Efectos de la adición de *bacillus spp*, en ensilaje de maíz (*Zea mays*) sobre la cinética de degradación ruminal *in situ* y fermentación ruminal *in vitro*. Ambato, Ecuador: Universidad técnica de Ambato; 2017. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/26308> (último acceso 22 de Noviembre de 2022).
45. Velasco J, Araque M, Araujo E, Longa A, Nieves B, Ramírez A, Sánchez K, Velasco E. En *Manual práctico de bacteriología clínica*. 1ª ed. Mérida-Venezuela: Universidad de Los Andes, Vicerrectorado Académico, CODEPRE; 2008. 17-122.
46. Drouin P, Tremblay J, Chaucheyras-Durand F. Sucesión dinámica de la microbiota durante el ensilado de maíz de planta entera después de la inoculación con *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus hilgardii* solo o en combinación. *Microorganisms*. 2019 Nov 21;7(12):595. doi: 10.3390/microorganisms7120595. PMID: 31766494; PMCID: PMC6955939.
47. Mionetto AC. Hogos toxicogénicos y producción de micotoxinas en silos de sorgo húmedo. Tesis de Maestría. Universidad de la República de Montevideo; 2017. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10220/1/uy24-18501.pdf> (último acceso 4 de Junio de 2023).
48. Koneman E, Allen S, Yanda W, Scherchenberger P, Winn W. *Diagnostico Microbiologico*. 5a ed. Buenos Aires-Argentina: Panamericana; 2001.

www.bdigital.uta.ve

**ANEXOS**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ANEXO 1



## ANEXO 2

