

SELECCIÓN DE LACTOBACILOS CON FINES DE PRODUCCIÓN DE INOCULANTES PARA ENSILAJE

Fabián Hernández-Hernández¹; Luis Alberto Miranda-Romero¹

¹ Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, km 38.5, Chapingo, Estado de México, C.P. 56230, MÉXICO.

RESUMEN

Los objetivos del presente estudio fueron aislar, caracterizar y seleccionar bacterias ácido lácticas, desde un ensilado de sorgo y con el uso del modelo de análisis multicriterio identificar cepas superiores. Con seis cepas seleccionadas más *Lactobacillus plantarum* como testigo; se estudió la densidad óptica máxima (**DOm**), tasa de crecimiento (**s**), fase lag (**L**), pH final (**pHf**), tasa de cambio de pH (**ΔpH**), consumo de sustrato (**CS**), producción de ácido láctico (**AcLc**) y eficiencia en el metabolismo de sustrato (**E**); en dos sustratos (glucosa y fructosa) y dos ambientes (aerobiosis y anaerobiosis). La cepa **C11** en glucosa se desempeñó mejor ($P < 0.0001$) en **AcLc** y **E** respecto al resto de las cepas cuando fueron evaluadas bajo aerobiosis, mientras que la cepa **C43** lo hizo con fructosa en anaerobiosis pero en **s** y **L**. El método de análisis multicriterio **AMC-3** fue el que mejor se ajustó a los requerimientos de selección. En aerobiosis la mejor cepa fue **C11** (0.2172) cuando creció en glucosa y **C25** (0.8713) en fructosa fue la menos deseable; en anaerobiosis la mejor selección fue la cepa **C1** (0.1623) en glucosa y la del desempeño más pobre la **C25** (0.8271) en fructosa. En conclusión, los atributos de curva crecimiento bacteriano, curva de pH y metabolismo de lactato, son adecuados para la selección de cepas de lactobacilos, pero es necesario emplear algún modelo numérico para hacer una selección más precisa de cepas bacterianas, principalmente cuando se tienen más de dos atributos como criterio de selección.

Palabras clave: Bacterias lácticas, fermentación, lactato, análisis multicriterio.

SELECTION OF LACTOBACILLI WITH PRODUCTION PURPOSES OF SILAGE INOCULANTS

Fabián Hernández-Hernández¹; Luis Alberto Miranda-Romero¹

¹ Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, km 38.5, Chapingo, Estado de México, C.P. 56230, MÉXICO.

SUMMARY

The aims of this study were to isolate, characterize and select lactic acid bacteria from sorghum silage and with multicriteria analysis model to identify better strains. On six selected strains and *Lactobacillus plantarum* strain as a witness were studied the maximum optical density (**MOD**), rate of growth (**s**), lag phase (**L**), final pH (**pH_f**), rate of pH change (**ΔpH**), substrate consumption (**SC**), lactic acid production (**LcAc**) and efficiency of substrate metabolism (**E**); all this in two substrates (glucose and fructose) and two environments (aerobic and anaerobic). The strain **C11**, in glucose performed better ($P < 0.0001$) in **LcAc** and **E** compared to the rest of the strains when they were evaluated under aerobic conditions, and the strain **C43** was better with fructose under anaerobic conditions but in **s** and **L** parameters. The multicriteria analysis method **AMC-3**, was the that best meets to the selection requirements. In aerobic best strain was **C11** (0.2172) when grown in glucose and **C25** (0.8713) grown in fructose was the least desirable; in anaerobic conditions best selection was strain **C1** (0.1623) in glucose and poor performance the **C25** (0.8271) strain in fructose. To conclude, the attributes of bacterial growth curve, curve of pH and lactate metabolism, are suitable for the selection of strains of lactobacilli, but it is necessary to use a numerical model to make a more accurate selection of bacterial strains, mainly when you have more than two attributes as selection criteria.

Key words: Lactic acid bacteria, fermentation, lactate, multicriteria analysis.

INTRODUCCIÓN

El ensilaje es el método para conservar forraje de mayor utilización. La meta de ensilar es, mediante el control de la fermentación anaeróbica, conservar al máximo el valor nutritivo del forraje verde, lográndose mediante la reducción de pérdida de materia seca, producción de ácido butírico y nitrógeno amoniacal (Jones *et al.*, 2004). La calidad del ensilado depende de la eficiente producción de ácido láctico para establecer el pH entre 3.8 y 4.2 (Chandrasekaran *et al.*, 2010). La fermentación láctica es realizada por bacterias ácido lácticas (BAL) homofermentativas y heterofermentativas. Así, cuando la densidad de las bacterias lácticas epifíticas es baja aumenta la posibilidad de no obtener una buena fermentación (Chaverra y Bernal, 2000; Silveira y Franco, 2006).

Los aditivos se usan para corregir las deficiencias en el proceso de ensilaje. Entre los aditivos se encuentran los inoculantes bacterianos (Charmley, 2001; McEniry *et al.*, 2007). Los inoculantes son BAL seleccionadas por su habilidad para mejorar la fermentación, los más comunes son con base en especies de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Ohmomo *et al.*, 2002). Su uso favorece la dominancia de bacterias homofermentativas, la rápida acidificación del medio y limitan el crecimiento de microorganismos indeseables.

Los inoculantes usados en México son cepas de BAL seleccionadas para condiciones y forrajes distintos a los que comúnmente se cosechan en las regiones ganaderas del país, lo cual puede reducir su efectividad.

El presente estudio tiene por objetivos el aislamiento, caracterización y selección de cepas nativas de BAL con la finalidad de usarse en inoculantes para ensilaje de forrajes en diversas regiones de México, así mismo recomendar el uso del método de análisis multicriterio para la selección de cepas bacterianas que cumplan una serie de valoraciones simultáneas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo se realizó de un ensilado de sorgo forrajero ubicado en el Centro Demostrativo Tecnológico “La Noria” del Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura-Banco de México (FIRA), localizado en el km 3.5 de la carretera Tamuín-San Vicente Tancuayalab Tamuín, San Luis Potosí, de clima cálido subhúmedo con precipitación anual de 928 mm, la temperatura media anual de 26.8 °C (García, 1988). La fase de laboratorio se desarrolló en los laboratorios de Agronomía del Instituto Tecnológico de Ciudad Valles, S.L.P., y de Microbiología Pecuaria del Departamento de Enseñanza e Investigación en Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco Estado de México.

Del ensilado de sorgo se colectaron cuatro muestras de 100 g cada una, estas se trasladaron al laboratorio de Agronomía del Instituto Tecnológico de Ciudad Valles, S.L.P., determinándose el pH y contenido de materia seca (MS).

Para el aislamiento de bacterias ácido lácticas fue adaptada la técnica de conteo en placa (Cai *et al.*, 1999), que consistió en hacer diluciones seriadas (10^{-10}) en solución salina estéril (NaCl, 0.85%). Las diluciones de 10^{-2} a 10^{-10} fueron inoculadas (37 °C por 48 a 72 h), por duplicado en medio de cultivo Agar-ROGOSA en cajas Petri, por el método de vaciado en placa.

Al término de la primera incubación cada caja de Petri fue analizada para cuantificar las Unidades Formadoras de Colonia (UFC), haciéndose también una caracterización macroscópica para identificar BAL que fueron sujetas a una segunda incubación y posteriormente se realizó la caracterización microscópica en fresco y tinción de Gram.

Para las pruebas de homofermentación, curva de crecimiento, pH y eficiencia, se seleccionaron UFC que presentaran bacterias en forma de bacilos, agrupación en racimo, tinción de Gram positivo y sin motilidad.

Después de la caracterización se procedió a la identificación alfanumérica de las cepas (C de cepa y el número correspondiente al orden cronológico en que se aisló) y se inició la selección mediante la prueba de crecimiento en anaerobiosis por el método de tubo rolado (Hungate, 1969) para después diferenciar a las bacterias homofermentativas (Hm) de las heterofermentativas (Ht), utilizando el medio diferencial para bacterias

homofermentativas y heterofermentativas (MDHH) desarrollado por McDonald *et al.* (1987), al cual se le modificó la fuente de aminoácidos por agar soya tripticaseína.

A las cepas homofermentativas que crecieron en anaerobiosis les fue determinada la curva de crecimiento bacteriano. Los parámetros de la curva de crecimiento fueron: fase de retardo o lag (**L**); tasa de crecimiento (**s**); tiempo (**t**) y crecimiento máximo estimado como densidad óptica máxima (**DOm**). Los valores para **L**, **s** y **DOm**, fueron estimados (SAS 9.1), de acuerdo al siguiente modelo logístico (Schofield, 1994).

$$DO = \frac{DOm}{(1 + e^{(2-4*s*(t-L)})}$$

Dónde: **DO** = Densidad óptica; **DOm** = Densidad óptica máxima (máximo crecimiento); **e** = Base logaritmo natural; **s** = Tasa de crecimiento (h^{-1}); **t** = Tiempo (h) y **L** = Fase de retardo o Lag (h).

La curva de crecimiento para cada cepa se realizó en aerobiosis (AE) y anaerobiosis (AN), y utilizando dos sustratos: glucosa y fructosa. La curva de reducción de pH se midió solo en AE y en ambos sustratos, en AN únicamente se registró el pH inicial (**pHo**) y pH final (**pHf**) de la curva de crecimiento. Para relacionar el número de células bacterianas en función de los valores de densidad óptica se procedió a realizar una curva estándar de crecimiento microbiano por el método de conteo de células viables y de turbidimetría.

A las cepas que mostraron el mejor comportamiento de crecimiento y tasa de disminución de pH se les determinó su eficiencia en la producción de lactato. Para lo cual se determinaron los micromoles (μmol) de sustrato fermentado después de 12 h de incubación, por diferencia entre la cantidad de sustrato inicial menos la cantidad de sustrato residual. También se midió la cantidad de ácido láctico producido. La eficiencia se calculó dividiendo los micromoles de ácido láctico producido entre la cantidad de sustrato fermentado.

La prueba se realizó en seis cepas seleccionadas y en una cepa testigo de *Lactobacillus plantarum* obtenida de un inoculante comercial con tres repeticiones.

La eficiencia se determinó en dos ambientes: aerobiosis y anaerobiosis; y se utilizaron dos sustratos: glucosa y fructosa.

Para determinar carbohidratos solubles se empleó el método fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956) y para la medición de ácido láctico fue adaptada la técnica Barker-Summerson (Taylor, 1996).

Para conocer los micromoles del sustrato (glucosa y fructosa) se realizó una curva tipo o estándar usando una solución 0.01% p/v de D-glucosa y fructosa. También para el ácido láctico se obtuvo una curva estándar usando lactato de zinc.

Los ambientes (aerobiosis y anaerobiosis) se analizaron por separado. En cada ambiente fueron estudiados 14 tratamientos (2 sustratos y 7 cepas) con tres repeticiones. Las variables analizadas fueron: densidad óptica máxima (**DOM**), tasa de crecimiento (**s**), fase lag (**L**), pH final (**pHf**), tasa de cambio de pH (**ΔpH**), consumo de sustrato (**CS**), producción de ácido láctico (**AcLc**) y eficiencia en el metabolismo de sustrato (**E**). Para el análisis se utilizó un diseño completamente al azar empleando el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$$

Dónde: y_{ij} = Valor de la variable respuesta del tratamiento i en la repetición j ; μ = Media general; T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento, $i = 1, 2, \dots, 14$; ξ_{ij} = Error experimental en la j -ésima repetición del i -ésimo tratamiento; $j = 1, \dots, 3$

Para el análisis de varianza se usó el procedimiento ANOVA del SAS 9.1. y Tukey para la prueba de comparación de medias.

Para la jerarquización y selección de cepas se usaron los siguientes métodos basados en el modelo de análisis multicriterio (AMC) (Aznar y Guijarro 2005): **AMC-1**: Normalización por suma + método CRITIC + suma ponderada; **AMC-2**: Normalización por rango + método CRITIC + suma ponderada; **AMC-3**: Normalización por intervalo [0,1) + método CRITIC + suma ponderada y **AMC-4**: Normalización por suma + método de entropía + suma ponderada

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestreo, aislamiento y caracterización

El contenido de materia seca promedio fue de 31.12% y pH de 4.26. La población de bacterias lácticas fue de 1.65×10^6 Unidades Formadoras de Colonia por gramo de materia fresca (UFC g^{-1} MF), en base seca fue de 5.29×10^6 UFC g^{-1} MS.

De la incubación inicial fueron aisladas 44 cepas típicas de BAL, de las cuales únicamente 17 cepas, que al pasar por la prueba de anaerobiosis y tipo de fermentación fueron seleccionadas las siguientes: **C1, C4, C5, C11, C25 y C43**. A partir de ésta prueba se continuó investigando con estas seis cepas y *Lactobacillus plantarum* (**LP**) como cepa testigo obtenida de un inoculante comercial.

Prueba en aerobiosis

Curva de Crecimiento

De la cinética de crecimiento, **DOm** indicó un mayor crecimiento ($P < 0.0001$) de las BAL en glucosa (3.3×10^8 UFC mL^{-1}) que en fructosa (2.3×10^8 UFC mL^{-1}). Todas las cepas que crecieron en glucosa tienen una **DOm** mayor a la media general (μ), excepto **LP**; mientras que en fructosa solo la cepa **C1** fue superior ($P < 0.0001$) a la media general (Cuadro 1). En glucosa, **C25** mostró el máximo crecimiento (5.2×10^8 UFC mL^{-1}) y **LP** registró el mínimo (1.5×10^8 UFC mL^{-1}), siendo el orden en crecimiento: **C25, C43, C4, C1, C5, C11 y LP** (Cuadro 1). En fructosa, este orden fue **C1, C11, C5, C43, C4, LP y C25**.

Con relación a la tasa de crecimiento (**s**) la diferencia entre sustratos fue apenas significativa (glucosa: 0.0889; fructosa: 0.0800), la mayor diferencia en glucosa se observó con **LP** y **C11** mostró más diferencia en fructosa. La mejor tasa de crecimiento en general fue para **LP** en glucosa mientras que el valor más bajo lo registró **C25** en fructosa. Sin embargo, la misma cepa **C25** en glucosa fue la segunda mejor, con una diferencia poco significativa con respecto a **LP** en glucosa ($P < 0.0001$).

En la fase de retardo (**L**), **LP** tuvo mejor desempeño entre sustratos ($P < 0.0001$), mientras que **C43** (en glucosa y fructosa), **C1** y **C25** en glucosa fueron las que tuvieron

mayor valor de **L**, no mostrando diferencias entre ellas. Sin embargo, **C1** y **C25** muestran diferencias ($P < 0.0001$) entre sí cuando se trata de diferente sustrato, al igual que **C4** y **C5**, siendo **C11** la única que se comporta igual que **LP** y **C43** (Cuadro 1). El valor de la media de **L** para todas las cepas en fructosa (1.66) es mejor ($P < 0.0001$) que la media en glucosa (2.65).

Al analizar la curva de crecimiento en sus tres atributos (**DOM**, **s** y **L**), se observó que las cepas **C1**, **C4**, **C5**, **C11** y **C43** son las que mejor cumplen este objetivo, en aerobiosis tanto para glucosa como en fructosa.

Curva de pH

El pH final (**pHf**) en glucosa (4.15) fue mejor que con fructosa (4.38) ($P < 0.0001$). En ambos sustratos **C25** y **LP** produjeron los valores más altos de pH (Cuadro 1). En el resto de las cepas el pH final fue similar indistintamente del sustrato, aunque el valor más bajo lo tuvo **C1** en glucosa (3.92).

La media de tasa de cambio de pH (**Δ pH**) por sustrato fue (-0.1611) para glucosa superior a fructosa (-0.1512), incluso glucosa estuvo por arriba de la media general en aerobiosis (-0.1561) ($P < 0.0001$) (Cuadro 1). **LP** y **C25** tuvieron la menor tasa de cambio de pH ($P < 0.0001$) en glucosa. Todas las cepas redujeron mejor el pH en fructosa que con glucosa, solo **C1** y **C11** lo redujeron mejor en glucosa ($P < 0.0001$) (Cuadro 1).

En estudios donde se han aplicado ácidos directamente al forraje, se ha logrado una mayor disminución del pH que con el uso de inoculantes bacterianos pero, al igual que cepas estrictamente homofermentativas, tienen menor tiempo de estabilidad aeróbica (Rowghani and Zamiri, 2009). Una buena opción es el uso de inoculantes mixtos de bacterias homo y heterofermentativas, pues cepas heterofermentativas de *Lactobacillus buchneri* y *Propionibacterium acidipropionici* disminuyen el pH en ensilados de trigo, sorgo y maíz al mismo nivel que la bacteria homofermentativa *Lactobacillus plantarum*, con la ventaja de que pueden mejorar considerablemente la estabilidad aeróbica. Se ha tratado de mejorar la estabilidad aeróbica con la combinación de ácidos y sales (propiónico, fórmico, sales de amonio) con buenos resultados, aunque no bajan el pH a menos de 4.2 y con posibles implicaciones sobre el consumo animal.

Eficiencia de producción de lactato

En el consumo de sustrato (**CS**), la cepa **C1** fue la que mayor consumo en glucosa, seguida de **C4** en glucosa y la misma **C4** pero en fructosa. En contraste, **C25** fue la de menor consumo (glucosa, 2.76 y fructosa; 2.39 $\mu\text{mol mL}^{-1}$). Las cepas **C5**, **C11** y **LP** en glucosa y **C1** y **C11** en fructosa formaron el grupo de las cepas con mayor consumo. El grupo intermedio incluyeron las cepas **C5**, **C43** y **LP** en fructosa y **C43** en glucosa ubicándose en un rango que va de 4.59 a 6.53 $\mu\text{mol mL}^{-1}$. Entre sustratos se registró un mayor consumo de glucosa (7.06 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) que fructosa (6.32 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) ($P < 0.0001$).

Para la producción de ácido láctico (**AcLc**), la cepa **C25** no metabolizó suficiente sustrato y no disminuyó el pH. Las cepas **C11** y **C4** en glucosa produjeron mayor cantidad de lactato ($P < 0.0001$); le siguieron **Glucosa-C1** y **Glucosa-C5**; en tercer lugar **Fructosa-C1** y **Fructosa-C1**. Los tratamientos **Fructosa-C4**, **Glucosa-C43** y **Fructosa-C5** formaron un cuarto grupo que difirió de los tres anteriores ($P < 0.0001$). **Fructosa-C43** ocupó el quinto sitio con respecto a todos los anteriores, mientras que los tratamientos testigo **Glucosa-LP** y **Fructosa-LP** se situaron en penúltimo lugar y el último sitio fue ocupado por los tratamientos **Glucosa-C25** y **Fructosa-C25** (Cuadro 1).

La eficiencia (**E**) fue mayor para glucosa (0.6119) que en fructosa (0.5448) ($P < 0.0001$), esta diferencia se observó para la mayoría de las cepas exceptuando **C25** y **LP** que tuvieron mayor eficiencia en fructosa (Cuadro 1). Al comparar los tratamientos se encontró que **Glucosa-C11** fue más eficiente y **Glucosa-LP** fue la de menor eficiencia ($P < 0.0001$). En el intermedio se posicionó **Fructosa-C43** con diferencia marcada, el resto de tratamientos compartió agrupación con alguno de estos tres tratamientos. El valor más alto de eficiencia fue de 0.84 y el valor mínimo fue de 0.28.

Cuadro 1. Atributos del crecimiento (DOm, s, L) y de la fermentación láctica en BAL seleccionadas, crecidas en dos sustratos y en aerobiosis.

Tratamiento		Atributo							
Sustrato	Cepa	DOm	s	L	pHf	ΔpH	CS	AcLc	E
Glucosa	C1	0.73 ^{bc}	0.0869 ^{de}	3.51 ^a	3.92 ^e	-0.1866 ^{ef}	8.84 ^a	12.15 ^{ab}	0.69 ^{abc}
	C4	0.76 ^{bc}	0.0745 ^{def}	2.78 ^{ab}	3.93 ^e	-0.1882 ^{ef}	8.84 ^a	12.46 ^a	0.71 ^{abc}
	C5	0.72 ^{bc}	0.0764 ^{def}	2.85 ^{ab}	3.93 ^e	-0.1876 ^{ef}	8.42 ^{ab}	11.59 ^{abc}	0.69 ^{abc}
	C11	0.71 ^{cd}	0.0811 ^{def}	1.70 ^{bcd}	3.93 ^e	-0.1827 ^e	7.68 ^{abcd}	12.83 ^a	0.84 ^a
	C25	0.87 ^a	0.1142 ^{ab}	3.47 ^a	4.49 ^d	-0.1109 ^c	2.76 ^{fg}	1.31 ^h	0.30 ^{ef}
	C43	0.78 ^b	0.0663 ^f	3.58 ^a	4.06 ^e	-0.1590 ^d	5.71 ^{de}	9.00 ^{de}	0.79 ^{ab}
	LP	0.52 ^h	0.1230 ^a	0.73 ^d	4.77 ^c	-0.1125 ^c	7.19 ^{abcd}	3.94 ^g	0.28 ^f
Fructosa	C1	0.71 ^{cd}	0.0853 ^{de}	2.04 ^{bc}	3.94 ^e	-0.1970 ^{fg}	8.18 ^{abc}	10.79 ^{bc}	0.67 ^{abc}
	C4	0.63 ^{efg}	0.0697 ^{ef}	1.36 ^{cd}	3.95 ^e	-0.1932 ^{efg}	8.82 ^a	9.12 ^{de}	0.52 ^{cde}
	C5	0.64 ^{def}	0.0673 ^f	1.44 ^{cd}	3.96 ^e	-0.1920 ^{efg}	6.53 ^{bcde}	8.51 ^{ef}	0.65 ^{abc}
	C11	0.69 ^{cde}	0.0887 ^{cd}	1.81 ^{bcd}	3.95 ^e	-0.2005 ^g	7.45 ^{abcd}	10.29 ^{cd}	0.69 ^{abc}
	C25	0.57 ^{gh}	0.0663 ^f	0.99 ^{cd}	5.95 ^a	-0.0082 ^a	2.39 ^g	1.37 ^h	0.35 ^{def}
	C43	0.63 ^{efg}	0.0775 ^{def}	3.42 ^a	3.96 ^e	-0.1691 ^d	6.26 ^{cde}	7.08 ^f	0.57 ^{bcd}
	LP	0.61 ^{fg}	0.1048 ^{bc}	0.62 ^d	4.95 ^b	-0.0982 ^b	4.59 ^{ef}	3.44 ^g	0.37 ^{def}
DMS		0.07	0.0178	1.22	0.16	0.01	2.02	1.43	0.24
Media General		0.684	0.0844	2.16	4.26	-0.1561	6.69	8.13	0.58

Medias en la misma columna con al menos una literal en común no son diferentes ($P \leq 0.05$).

DMS: Diferencia Mínima Significativa. **DOm:** Densidad óptica máxima; **s:** Tasa de crecimiento; **L:** Fase de retardo o fase lag; **pHf:** pH final; **ΔpH:** Tasa de cambio de pH; **CS:** Consumo de sustrato; **AcLc:** Ácido láctico; **E:** Eficiencia.

Prueba en anaerobiosis

Curva de Crecimiento

Todas las cepas incluyendo el testigo (**LP**) mostraron mayor crecimiento ($P < 0.0001$) en glucosa (1.1×10^8 UFC.mL⁻¹) que en fructosa (8.9×10^7 UFC.mL⁻¹). La mayor diferencia en **DOm** entre sustratos fue con la cepa **C43**, la cual al utilizar glucosa como sustrato alcanzó una población de 1.4×10^8 UFC.mL⁻¹ y de 4.6×10^7 UFC.mL⁻¹ en fructosa, seguida de la cepa **C4**. Estas dos cepas fueron las que mostraron diferencia entre sustrato ($P < 0.0001$), **LP** tuvo una diferencia mínima entre sustratos con 1.7×10^6 UFC.mL⁻¹. Por otro lado, el mayor crecimiento (1.8×10^8 UFC.mL⁻¹) lo presentó el

tratamiento **Glucosa-C4** y el menor crecimiento fue para **Fructosa-C43** (4.6×10^7 UFC mL⁻¹) (Cuadro 2)

La tasa de crecimiento (**s**) fue mayor en fructosa (0.1399) que en glucosa (0.1277) y la cepa **C43** registró la mayor diferencia entre la tasa de crecimiento en glucosa y fructosa (0.1030) ($P < 0.0001$). Los tratamientos **Fructosa-C43**, **Glucosa-C1**, **Fructosa-C1** y **Fructosa-C11** tuvieron la tasa de crecimiento más alta respecto al tratamiento **Glucosa-C43** (0.0921). Este último no fue diferente ($P < 0.0001$) con la tasa de crecimiento de **Glucosa-C25**, **Fructosa-C5**, **Fructosa-C25**, **Glucosa-C4**, **Glucosa-C5** y **Fructosa-C4**. Los tratamientos **Glucosa-LP** y **Fructosa-LP** se situaron en el intermedio de los grupos mencionados, aunque ligeramente superior a la media general (Cuadro 2).

La fase de retardo (**L**) no fue diferente entre sustratos ($P < 0.0001$). La cepa **C1** tuvo el mejor valor de **L** en fructosa y la cepa **C43** en glucosa. Los tratamientos **Fructosa-C43**, **Glucosa-C25** y **Fructosa-C25** registraron el mejor tiempo (3 h.), mientras que los tratamientos **Glucosa-LP**, **Glucosa-C43**, **Fructosa-LP** y **Fructosa-C1** tuvieron los tiempos más altos (>5 h.), el resto de los tratamientos oscilaron entre 3.8 y 4.4 h, (Cuadro 2).

Curva de pH

El pH se redujo mejor ($P < 0.0001$) en glucosa (4.12) que en fructosa (4.15). A nivel de tratamiento **Fructosa-LP**, **Fructosa-C25** son los que tuvieron pH final más alto, seguidos de **Glucosa-C25**, **Glucosa-LP** y **Fructosa-C43**. Los tratamientos que mejor bajaron el pH fueron **Fructosa-C5**, **Glucosa-C4**, **Glucosa-C5** y **Fructosa-C11**, el tratamiento **Glucosa-C43** difirió del resto de los tratamientos ($P < 0.0001$) (Cuadro 2). En general las cepas seleccionadas, excepto **C25**, redujeron mejor el pH que la cepa testigo **LP**.

Las cepas **LP** y **C25** presentaron una tasa de cambio de pH menor que el resto de las cepas con valores que van de -0.0084 a -0.0095, este desempeño, sin embargo fue todavía menor cuando las bacterias crecieron en fructosa que en glucosa, mientras que las bacterias de la cepa **C4** cultivadas en glucosa registraron la mejor tasa de cambio de pH (Cuadro 2).

Eficiencia de producción de lactato

El tratamiento **Glucosa-C11** sobresalió con el mayor consumo de sustrato (**CS**) ($P < 0.0001$). Ocho de los tratamientos se situaron por arriba de la media general, de los que están bajo la media general cuatro corresponden a fructosa (Cuadro 2). Con excepción de la cepa **C1**, todas las cepas metabolizaron mejor la glucosa que fructosa en anaerobiosis. En promedio el consumo de glucosa fue mayor que el de fructosa.

Aún cuando se consumió más glucosa, se produjo más ácido láctico (**AcLc**) a partir de fructosa que de glucosa. Únicamente las cepas **C4** y **C5** mantuvieron la misma tendencia de producción de ácido láctico y mayor consumo en glucosa, las cepas **C43** y **LP** revirtieron completamente esa tendencia, y produjeron más ácido láctico a partir de fructosa aun cuando consumieron más glucosa (Cuadro 2).

Ésta preferencia responde a la facilidad de la fructosa para entrar a la glucolisis por la vía de homofermentación, además en aerobiosis la fructosa puede servir como aceptor de electrones lo que favorece a cepas heterofermentativas, pero a cambio forman más acético y manitol (Salminen *et al.*, 2004).

En la eficiencia (**E**) las cepas **C5**, **C11**, **C43** y **LP** resultaron más eficientes en fructosa. Los tratamientos **Fructosa-C43**, **Fructosa-C5**, **Fructosa-C11** y **Glucosa-C1** fueron los más eficientes para producir ácido láctico, mientras que **Glucosa-C25**, **Glucosa-LP**, **Glucosa-C43** y **Fructosa-C25** fueron los menos eficientes. La media de eficiencia para fructosa fue mayor que glucosa ($P < 0.0001$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Atributos de crecimiento (DOM, s, L) y de la fermentación láctica en BAL seleccionadas, crecidas en dos sustratos y en anaerobiosis.

Tratamiento		Variables							
Sustrato	Cepa	DOM	s	L	pHf	ΔpH	CS	AcLc	E
Glucosa	C1	0.34 ^{cd}	0.1898 ^a	4.18 ^b	3.87 ^{ef}	-0.0168 ^f	8.00 ^{abc}	11.84 ^a	0.74 ^{ab}
	C4	0.57 ^a	0.1093 ^{def}	3.81 ^{bcd}	3.85 ^f	-0.0170 ^f	7.82 ^{abc}	9.99 ^{bcd}	0.64 ^b
	C5	0.54 ^a	0.1141 ^{cdef}	3.90 ^{bc}	3.86 ^f	-0.0169 ^f	8.42 ^{ab}	10.36 ^{abcd}	0.62 ^b
	C11	0.40 ^{cd}	0.1506 ^{bc}	4.06 ^b	3.88 ^{ef}	-0.0167 ^{ef}	9.51 ^a	11.40 ^{ab}	0.60 ^b
	C25	0.35 ^{cd}	0.0944 ^f	3.19 ^{de}	4.74 ^{bc}	-0.0091 ^{bc}	2.20 ^f	1.19 ^g	0.28 ^c
	C43	0.51 ^{ab}	0.0921 ^f	5.23 ^a	3.93 ^e	-0.0162 ^e	6.80 ^{bcd}	4.18 ^{ef}	0.31 ^c
	LP	0.31 ^d	0.1437 ^{bcd}	5.18 ^a	4.69 ^c	-0.0095 ^c	4.87 ^{de}	2.58 ^{fg}	0.28 ^c
Fructosa	C1	0.33 ^{cd}	0.1688 ^{ab}	5.55 ^a	3.89 ^{ef}	-0.0165 ^{ef}	8.48 ^{ab}	10.91 ^{abc}	0.64 ^b
	C4	0.42 ^{bc}	0.1179 ^{cdef}	3.82 ^{bcd}	3.87 ^{ef}	-0.0167 ^{ef}	7.45 ^{bc}	9.00 ^d	0.60 ^b
	C5	0.51 ^{ab}	0.0990 ^{ef}	3.80 ^{bcd}	3.85 ^f	-0.0169 ^f	6.17 ^{cde}	9.49 ^{cd}	0.77 ^{ab}
	C11	0.39 ^{cd}	0.1578 ^{ab}	4.44 ^b	3.86 ^f	-0.0168 ^{ef}	7.56 ^{abc}	11.28 ^{ab}	0.74 ^{ab}
	C25	0.34 ^{cd}	0.1054 ^{def}	3.27 ^{cde}	4.78 ^{ab}	-0.0087 ^{ab}	1.64 ^f	1.00 ^g	0.34 ^c
	C43	0.18 ^e	0.1951 ^a	3.00 ^e	4.01 ^d	-0.0154 ^d	5.31 ^{de}	9.31 ^{cd}	0.89 ^a
	LP	0.31 ^d	0.1353 ^{bcde}	5.28 ^a	4.82 ^a	-0.0084 ^a	4.31 ^e	5.48 ^e	0.63 ^b
DMS		0.10	0.0387	0.66	0.07	0.0006	2.04	1.74	0.22
Media General		0.39	0.1338	4.19	4.14	-0.0144	6.32	7.71	0.58

Medias en la misma columna con al menos una literal en común no son diferentes ($P \leq 0.05$).

DMS: Diferencia Mínima Significativa. **DOM:** Densidad óptica máxima; **s:** Tasa de crecimiento; **L:** Fase de retardo o fase lag; **pHf:** pH final; **ΔpH:** Tasa de cambio de pH; **CS:** Consumo de sustrato; **AcLc:** Ácido láctico; **E:** Eficiencia.

Selección de cepas

El método **AMC-3** distribuyó mejor los pesos (w_j) en ambos ambientes, asignando mayor importancia al **pH**, **ΔpH** y '**s**' en aerobiosis, mientras que en anaerobiosis se calificó mejor al **pH** y **ΔpH**. El método **AMC-4** fue el menos adecuado para seleccionar cepas.

CONCLUSIONES

EL ensilado de sorgo forrajero permitió el aislamiento de cepas de bacterias lácticas homo y heterofermentativas, anaerobias y aerobias facultativas.

Las cepas mostraron variación en su cinética de crecimiento, capacidad de disminuir pH y eficiencia en el metabolismo de carbohidratos hidrosolubles, lo que permitió seleccionar cepas superiores. Las cepas seleccionadas mostraron características de bacterias homofermentativas facultativas. En anaerobiosis mostraron más afinidad por fructosa, en aerobiosis por glucosa y se comportaron mejor que la cepa testigo (*Lactobacillus plantarum*), con excepción de la cepa **C25**.

El método cuantitativo de análisis multicriterio fue una herramienta útil para calificar e identificar cepas superiores al conjuntar los diferentes atributos en una sola calificación. El método **AMC-3** fue el que mejor ajustó las variables como criterios microbiológicos de selección.

Los parámetros de curva de crecimiento bacteriano, curva de reducción del pH y el metabolismo de carbohidratos hidrosolubles son imprescindibles para caracterizar y seleccionar cepas del género *Lactobacillus spp.*

LITERATURA CITADA

- Aznar, B. J. y Guijarro, M. F. 2005. Nuevos Métodos de Valoración: Modelos Multicriterio. España. 192 pp.
- Cai, Y., Benno, Y., Ogawa, M. and Kumai, S. 1999. Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *Journal of Dairy Science* 82:520–526.
- Chandrasekaran, B., Annadurai, K., and Somasundaram, E. 2010. A Textbook of Agronomy. New Age International Publishers. New Delhi, India. 835 pp.
- Charmley, E. 2001. Towards improved silage quality—A review. *Canadian Journal Animal Science* 81:157–168.
- Chaverra, G. H., Bernal, E. J. 2000. El Ensilaje en la Alimentación del Ganado Vacuno. Primera Edición. IICA. Tercer Mundo Editores. Colombia. 153 pp.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, Cuarta edición, México. 217 pp.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In Norris, J. R. and Ribbons, D. W. *Methods in Microbiology*. Vol. 3B. Academic Press. 117–132.
- Jones, C.M., Heinrichs, A. J., Roth, G. W., Ishler, V. A. 2004. From Harvest to Feed: Understanding Silage Management. PENNSTATE. The Pennsylvania State University. USA. 34 pp.
- McDonald, L. C., McFeeters, R.F., Daeschel, M. A. and Fleming, H.P. 1987. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 53:1382-1384.
- McEniry, J., O’Kiely, P., Clipson, N. J. W., Forristal, P. D. and Doyle, E. M. 2007. Manipulating the ensilage of wilted, unchopped grass through the use of additive treatments. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 46:77–91.
- Ohmomo, S., Tanaka, O., Kitamoto, H. K., and Cai, Y. 2002. Silage and Microbial Performance, Old story but new problems. *JARQ* 36:59–71.
- Rowghani, E. and Zamiri, M. J. 2009. The effects of a microbial inoculant and formic acid as silage additives on chemical composition, ruminal degradability and nutrient digestibility of corn silage in sheep. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 10 (2). 110-118
- Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects. Third Edition. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. 628 pp.
- SAS System 9.1.3. 2002-2003 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schofield, P., Pitt, R. E. and Pell, A. N. 1994. Kinetics of Fiber Digestion from In Vitro Gas Production. *Journal Animal Science* 72:2980-2991.
- Silveira, P. E. A. y Franco, F. R. 2006. Conservación de Forrajes, Segunda Parte. REDVET Revista Electrónica de Veterinaria (en línea). Vol. VII, No. 11. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html> Consultado 20/08/2011.
- Taylor, K. A. C. C. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid, lactic acid, glyceraldehyde, acetaldehyde and formaldehyde. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56:49-58.