

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS



Universidad Politécnica de Cartagena
Departamento de Producción Vegetal

CALIDAD NUTRICIONAL DEL ENSILADO ALMACENADO BAJO DISTINTAS CONDICIONES CLIMÁTICAS

Juan Antonio Gutiérrez Iglesias

2017



CALIDAD NUTRICIONAL DEL ENSILADO ALMACENADO BAJO DISTINTAS CONDICIONES CLIMÁTICAS

Directores:

Prof. Juan Antonio Martínez López

Serge Nabeneza

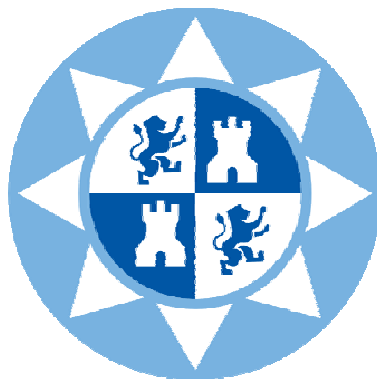
Proyecto Fin de Grado en Ingeniería de las Industrias Agroalimentarias

Universidad Politécnica de Cartagena

Cartagena, septiembre de 2017

CALIDAD NUTRICIONAL DEL ENSILADO ALMACENADO BAJO DISTINTAS CONDICIONES CLIMÁTICAS

Memoria presentada como Proyecto Fin de Grado en Ingeniería de las Industrias Agroalimentarias



Universidad Politécnica de Cartagena

Juan Antonio Gutiérrez Iglesias

VºBº: El Director

VºBº: El codirector

Juan Antonio Martínez LópezSerge Nabeneza

Profesor Titular de la UPCT

Investigador en la CIRAD



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE ESTUDIOS POR LOS DIRECTORES

Juan Antonio Martínez López, Profesor Titular de Universidad de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT)

Autoriza:

La presentación como Trabajo Fin de Estudios de la Titulación Grado en Ingeniería Agroalimentaria y de Sistemas Biológicos en la Universidad Politécnica de Cartagena de la memoria titulada: “Calidad nutricional del ensilado almacenado bajo distintas condiciones climáticas”, realizada por D. Juan Antonio Gutiérrez Iglesias durante una estancia de tres meses como estudiante Erasmus en el centro de investigación del CIRAD de Isla Reunión bajo la dirección y autorización del investigador Dr. Serge Nabeneza.

En Cartagena, a 9 de septiembre de 2017.

El Director del Proyecto

Dr. Juan Antonio Martínez López



Authorization letter

To whom it may concern,

I, Dalila Bentaleb, and Serge Nabeneza authorize Juan Antonio Gutierrez Iglesias to present the work he has done from April to June 2015 at the Center of Agricultural Research for Development (CIRAD) in Reunion Island, in the frame of a study exchange between University of Cartagena and the Institute of Technology of Reunion University. This work based on the dosage of acid butyrique by chromatography in gas phase in the silages of Reunion has been summarized in a report and an oral presentation.

Saint-Pierre the 16th of March

Signed by:

Dalila Bentaleb



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría decir que estas prácticas han sido para mí una experiencia increíble. Poder trabajar en un laboratorio de investigación durante 3 meses y ver cómo funciona un equipo de trabajo científico, aprender a manipular compuestos químicos peligrosos y las reglas que se deben seguir correctamente para trabajar con seguridad son aspectos sencillos para alguien habituado a ello, pero igualmente necesarios de aprender. Me gustaría acordarme de nuevo de Jérôme Minier (técnico del laboratorio) por todas sus explicaciones y consejos. Para mí ha sido una experiencia muy gratificante, ya que también he podido aprender el idioma francés y su vocabulario científico.

También agradecer a Dalila Bentaleb, directora de Relaciones Internacionales de la Universidad de Isla Reunión por toda la ayuda prestada tanto en el ámbito académico como personal en mi estancia en la universidad, así como en la empresa CIRAD.

Por último acordarme de mis compañeros estudiantes tanto en la universidad como en el laboratorio, por sus consejos, amabilidad y ayuda prestada en el tiempo de convivencia que pasamos juntos.

Contenido

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 8 |
| ABSTRACT..... | 9 |
| INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| CIRAD (un centro de investigación)..... | 10 |
| ENSILAJE: generalidades | 10 |
| Definición y objetivo | 12 |
| Proceso del ensilaje..... | 13 |
| Valor nutricional del ensilaje..... | 16 |
| Tipos de ensilaje | 17 |
| LOS ENSILAJES BUTÍRICOS..... | 18 |
| Características de los ensilajes butíricos | 20 |
| Efecto de los ensilajes butíricos sobre la palatabilidad..... | 21 |
| Contaminación de la leche por esporas butíricas | 21 |
| Estrategias para obtener un ensilaje bien conservado y una buena calidad microbiológica de la leche cruda | 22 |
| OBJETIVOS DEL PROYECTO | 24 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| Material vegetal | 25 |
| Método..... | 26 |
| RESULTADOS | 29 |
| Resultados CPG | 29 |
| Cálculo de los datos..... | 30 |
| DISCUSION DE RESULTADOS..... | 37 |
| CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS | 40 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 41 |

RESUMEN

Se ha llevado a cabo este estudio por la necesidad de determinar la calidad del alimento que se le proporciona al ganado bovino en Isla Reunión. En dicho estudio se evaluó la cantidad de ácido butírico presente en 50 muestras de ensilaje reunionés macerado en agua y congelado. La presencia de ácido butírico en el ensilaje supone una disminución de su calidad nutricional debido fundamentalmente a la acción de las bacterias del género *Clostridium* que provocan una putrefacción del forraje macerado.

Utilizamos la técnica de la cromatografía en fase gaseosa para determinar las cantidades no sólo de ácido butírico sino también de otros componentes del ensilaje como el ácido acético y el ácido láctico (mayoritariamente), que son característicos de la fermentación anaerobia realizada en el proceso de elaboración del ensilaje. Fermentación que llevan a cabo las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAC). Al realizar la fermentación, se produce una inhibición de los microorganismos que provocan la putrefacción. Pues, su éxito reside permitir la degradación hasta límites que son óptimos para la conservación del forraje, en unos valores de pH por debajo de 5.

Previamente al análisis de las 50 muestras de ensilaje, determinamos una gama patrón de la que conocíamos las cantidades de los componentes que la formaban para desarrollar una curva de calibración. Esta fue calculada a partir de una solución madre (SM) formada por 5 µL de ácido butírico puro y 2 mL de una mezcla éter/hexano 50:50 (V:V). A partir de dicha solución madre, se fueron haciendo diluciones sucesivas hasta construir la gama patrón mencionada anteriormente.

Muchos de los ensilajes analizados no presentaban una gran cantidad de ácido butírico, si bien los que poseían una cantidad de materia seca inferior al 20% sí que presentaban valores elevados de dicho ácido. Siendo los valores óptimos para la conservación del ensilaje entre el 25 y el 50% de la misma. El problema principal de la putrefacción de los ensilajes butíricos reside en una fase anterior a la maceración, justo tras el corte del forraje y durante el proceso de secado, cuando éste debe de quedar sin humedad. Una vez que el ensilaje es macerado y congelado este ya ha perdido parte de sus componentes debido a la humedad que ha retenido en esa fase previa a la maceración. Además, las muestras se encontraban demasiado diluidas en agua (fallo en el

procesado), esto se tradujo en una tasa baja de extracción del butírico durante el proceso.

ABSTRACT

This study has been conducted by the need to determine the quality of the food provided to cattle in Reunion Island. This study evaluated the amount of butyric acid present in 50 samples of silage macerated in water and frozen. The presence of butyric acid in silage represents a decrease of its nutritional quality, mainly due to the action of the bacteria of the genus *Clostridium* that cause the putrefaction of macerated fodder.

We used the technique of chromatography in gaseous phase which gave us the quantities not only of butyric acid, but also of other components of the silage as acetic acid and lactic acid (mostly), which are characteristic of the anaerobic fermentation during the process of elaboration of the silage. The normal fermentation process produces an inhibition of microorganisms that cause rot. Therefore, it is necessary to preserve the fodder from harmful microorganisms such as *Clostridium* reaching acid values of pH (below 5) where harmful microorganisms are unable to grow.

Prior to the analysis of 50 samples of silage, we determined a range pattern which knew the quantities of components that formed it in order to build a calibration curve. This was calculated from a stock solution (SM) composed by 5 µL of pure butyric acid and 2 mL of a mixture ether/hexane 50:50 (v:v). From this stock solution, were prepared successive dilutions up to build the calibration curve mentioned above.

Many of the analyzed silages had not a large amount of butyric acid. Although those with dry matter contain less than 20% showed high values of this acid. The optimal values for the conservation of silage ranged between 25 and 50% of dry matter. The main problem of silages resides at an earlier stage to the maceration, after cutting the fodder and during the drying process, when it should be free of humidity. Once silage is macerated and frozen its progressive degradation is irremediable. In addition, when samples were too diluted in water, this translated into a low rate of extraction of the butyric acid during the process.

INTRODUCCIÓN

CIRAD (un centro de investigación)

El CIRAD (Center of Agricultural Research for Development at Reunion Island) es un centro de investigación francés que responde a los envites internacionales de la agricultura y del desarrollo. Su principal misión es la de producir y transportar nuevos conocimientos para acompañar el desarrollo agrícola y contribuir al debate sobre los grandes envites mundiales de la agronomía. Está compuesto por tres departamentos científicos: Sistemas Biológicos; Rendimiento de los Sistemas de Producción y de Transformación Tropical; Medio Ambiente y Sociedades. Está presente tanto en Francia (Europa), como en los territorios de ultramar franceses.

Sus actividades relevantes se centran en las ciencias de sociales y las ciencias de la ingeniería aplicadas a la agricultura, la alimentación y los territorios rurales. El CIRAD se compromete a estar más cerca de los hombres y de la Tierra sobre retos complejos y evolutivos que se nos presentan en la actualidad: seguridad alimentaria, gestión de los recursos naturales, desigualdades y lucha contra la pobreza.

En la Isla Reunión, el centro de investigación está ligado al estado y las colectividades locales, en una perspectiva de cooperación regional en el corazón del Océano Índico. El CIRAD participó en las reflexiones de la investigación internacional sobre la seguridad alimentaria, el desarrollo duradero y la adaptación de la agricultura al cambio climático.

El autor de este proyecto trabajó durante tres meses en el Departamento de Sistemas de Producción Tropical y dentro del mismo en el Departamento para el Desarrollo Ganadero del CIRAD en St Pierre, en Isla Reunión. Este estudio se centra en la alimentación animal y en particular en el ensilaje para ganado bovino, tarea que se me encomendó durante mi estancia en dicho centro.

ENSILAJE: generalidades

Las variaciones climáticas afectan la composición de los forrajes utilizados en alimentación bovina tanto a nivel de sus rendimientos como de sus cualidades nutritivas. El ensilaje nos permite estar seguros de que los animales ingieren los alimentos que nos interesan con el número de componentes necesarios para su correcto desarrollo. (De la Rosa, 2005). La utilización de forrajes conservados tiene grandes

beneficios para la salud de los animales, ya que de esta forma conseguimos que estos ingieran exactamente el alimento que queremos en la dosis que nos interesa. Reducir las pérdidas de producción y aumentar el sistema de almacenaje permite estabilizar la producción de la industria, esto vuelve al ganadero más competitivo en el mercado.

El ensilaje es también un método económico de alimentación animal. Este hecho es muy importante ya que las posibilidades económicas de los ganaderos son limitadas y esto hace del ensilaje la alternativa más elegida. Se estima que aproximadamente 200 millones de toneladas de materia seca son anualmente utilizadas para ensilaje en el mundo, con un coste de US \$100-150 por tonelada. Este coste comprende: la tierra y el cultivo (aproximadamente 50%), segado y polietileno (30%), silo (13%) y aditivos (7%). (Garcés *et al.*, 2007).

En Europa, los agricultores de los países como Holanda, Alemania y Dinamarca almacenan más del 90% del forraje como silo. A nivel mundial, los alimentos más importantes utilizados para ensilaje son el maíz, la alfalfa y las gramíneas. El trigo, el sorgo y algunas leguminosas son también utilizados para ensilaje. (http://www.fenalce.org/arch_public/ensilaje98.pdf “ensilage98.pdf”).

En países que poseen un clima tropical (como es el caso de Isla Reunión), El ensilaje es una excelente opción para la alimentación en las ganaderías por la gran variedad de granos y forrajes, la intensidad solar y el nivel de lluvias que existen en el trópico. Por las condiciones anteriores se pueden producir varias cosechas en el año, mientras en los países con estaciones sólo se cosecha una vez al año. El aire reunionés es calificado de húmedo. La humedad en invierno en las zonas costeras se establece en un 50-55% mientras que en las zonas altas se sitúa alrededor del 60-70%. Por otro lado, en verano estos porcentajes suben hasta situarse en torno al 80-95%. El porcentaje de humedad es más elevado en las zonas altas, ya que las temperaturas están más próximas al punto de rocío. Si bien es cierto también, que el aire en las zonas altas contiene menos vapor de agua por unidad de volumen. La ganadería se establece en las zonas altas, ya que las temperaturas costeras no permiten su explotación, donde la utilización del ensilaje se vuelve clave para poder alimentar correctamente a los animales permitiendo una conservación larga y duradera y sin grandes modificaciones de las características del forraje utilizado para el ensilaje.

Definición y objetivo

El ensilaje es un proceso de conservación por vía húmeda del forraje, basado en la fermentación anaerobia (mayoritariamente fermentación láctica). Sus productos son el ácido láctico y el ácido acético, los cuáles son producidos por las bacterias lácticas (BAC) y acéticas respectivamente. Dicha fermentación provoca una disminución del pH por debajo de 5, produciendo una inhibición de los microorganismos que provocan la putrefacción, ya que su éxito reside en permitir la degradación hasta límites que son óptimos para conservación del forraje. Por lo que, el fin esencial del ensilado es conservar los forrajes con un mínimo de pérdidas de materia seca y de nutrientes, manteniendo una buena aceptabilidad por el ganado y sin que se produzcan durante el proceso sustancias tóxicas para la salud animal. Entre las ventajas que conlleva su utilización, destacan una mayor independencia ante condiciones meteorológicas adversas, pudiendo además emplearse en forrajes como el maíz u otros productos de gran interés alimenticio, en los que no cabe otra forma de preservación y facilita la mecanización de las explotaciones, ya que el proceso de recolección, realización y distribución del ensilado, puede ser íntegramente mecanizado.

El ensilaje es almacenado para una mejor y más larga conservación de los forrajes. El objetivo de la conservación es la preservación de la calidad nutricional del forraje para alimentar los animales en períodos de déficit. El ensilaje puede ser almacenado durante meses e incluso años, y puede ser utilizado en cualquier momento. (Martínez *et al.*, 1998).

Por tanto, con las afirmaciones descritas anteriormente, podemos deducir los objetivos del ensilaje (Fuente: <http://sian.inia.gob.ve> “evaluación de la calidad de los ensilajes”).:

- Disminuir los efectos negativos del pastoreo y sobre pastoreo en la degradación de los recursos naturales, suelo y agua, contribuyendo de esta manera a la sostenibilidad de los ecosistemas frágiles.
- Proporcionar forraje de buena calidad durante todo el año, especialmente durante la ausencia de lluvias.
- Aprovechar los excedentes de forraje durante los periodos de lluvias.
- Incrementar la carga animal de la explotación.
- Mejorar el balance de la dieta y los niveles de producción en bovinos.

Proceso del ensilaje

La planta transmite al animal los nutrientes necesarios para su desarrollo y reproducción. En todos los vegetales, el contenido celular está compuesto de proteínas, de azúcares y de lípidos que son los nutrientes altamente digestibles (ADF), más del 80% de la MS. Mientras que la fibra de la pared celular (NDF), que contiene celulosa, la hemicelulosa y la lignina es de digestibilidad muy variable.

El objetivo del ensilaje es mantener las mismas condiciones que hay en los forrajes en el momento de la recolección. Cuando las especies forrajeras seleccionadas son ensiladas, el proceso comienza con la siembra de la cosecha, su desarrollo, su tiempo de recogida, y continúa con el corte y picado del silo, para impedir la entrada de aire y de agua. Una vez que el silo está maduro, es decir, en condiciones de alimentación del ganado, se lleva a cabo la abertura y la descarga del silo. (Roza y de la Roza Delgado, 1998).

Para obtener un buen ensilaje, tenemos que tener en cuenta tres aspectos principales:

a) El porcentaje de humedad del forraje

Se refiere a la cantidad de agua que debe tener un forraje. La humedad óptima para un buen silo es del 68-75%. Hay que tener en cuenta que el hecho de poseer una cantidad excesivamente elevada de humedad, no solo provoca putrefacciones, sino que puede descartar ese material vegetal para ensilaje. Contenidos elevados de agua son fatales para los forrajes.

b) El grado de maduración de la cosecha

Por regla general se acepta que las gramíneas, que pueden ser cortadas varias veces durante su vida productiva, se cosechen en un estado de prefloración. Por el contrario, la avena o el maíz, que dan de una a dos cosechas anuales, se deben cortar cuando el grano está en el estado lechoso. Unos 110 días después de la siembra para el caso de la avena, mientras que el maíz se debe cortar cuando las hojas inferiores de la planta comienzan a estar secas.

c) Compactación del forraje

El grado de compactación de cualquier producto es muy importante en el proceso de llenado del silo. La compactación del forraje es importante hacerla para la rápida expulsión de aire atrapado entre las partículas de forraje picado y evitar la fermentación no deseada por la degradación extrema de hidratos de carbono y la desnaturalización de proteínas por efectos de las altas temperaturas. (Argamentoría *et al.*, 1997).

El ensilaje se logra por medio de una fermentación láctica espontánea en condiciones anaerobias. Las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAC) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del forraje produciendo ácido láctico. Por otro lado, se formará también, aunque en menor cantidad ácido acético, tal y como hemos comentado anteriormente.

A continuación, se inician los cambios dentro de la masa de ensilaje. Estos cambios siguen un orden según las distintas fases:

1. Fase aerobia

El oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los microorganismos aerobios y aerobios facultativos como las levaduras y enterobacterias.

Durante esta fase se producen todos los cambios que se realizan justo después del corte del forraje y antes de quitar el aire (*Figura 1*). Cuando se produce el corte de la planta, la fotosíntesis cesa, pero la respiración continúa en el interior de las células vivas. Si existe oxígeno libre, tendremos una condición aerobia en la que principalmente azúcares y almidones, y una cantidad menor de grasa y proteína serán degradados a sustancias más simples. Este proceso debe ser detenido lo antes posible con un rápido embalado y empaquetado de la masa de ensilaje para evitar pérdidas por putrefacción.

Existen ciertas especies de levaduras son perjudiciales para el ensilaje ya que degradan el ácido láctico en CO₂ y H₂O, lo que eleva el valor del pH del mismo, permitiendo el desarrollo de otros organismos indeseables. También las enterobacterias son perjudiciales, ya que compiten con las BAC por los azúcares disponibles y porque degradan las proteínas.

2. Fase anaerobia. Fermentación

Esta fase comienza al producirse un ambiente anaeróbico (*Figura 1*). 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 BAC 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.

Las operaciones tales como el picado del pasto, llenado de silos, compactación y sellado deben hacerse con el rigor que estas prácticas necesitan para obtener un buen producto. Resulta fundamental la ausencia de oxígeno mientras se realizan estas operaciones, ya que será esta ausencia la que permitirá la degradación de carbohidratos y la consiguiente formación de ácidos orgánicos tales como el acético, propiónico, butírico y láctico. El objetivo final es que dentro de la masa de ensilaje se forme el ácido láctico únicamente, ya que los otros ácidos deterioran dicha masa, especialmente el butírico. Generalmente, esta fase dura entre 10 y 25 días.

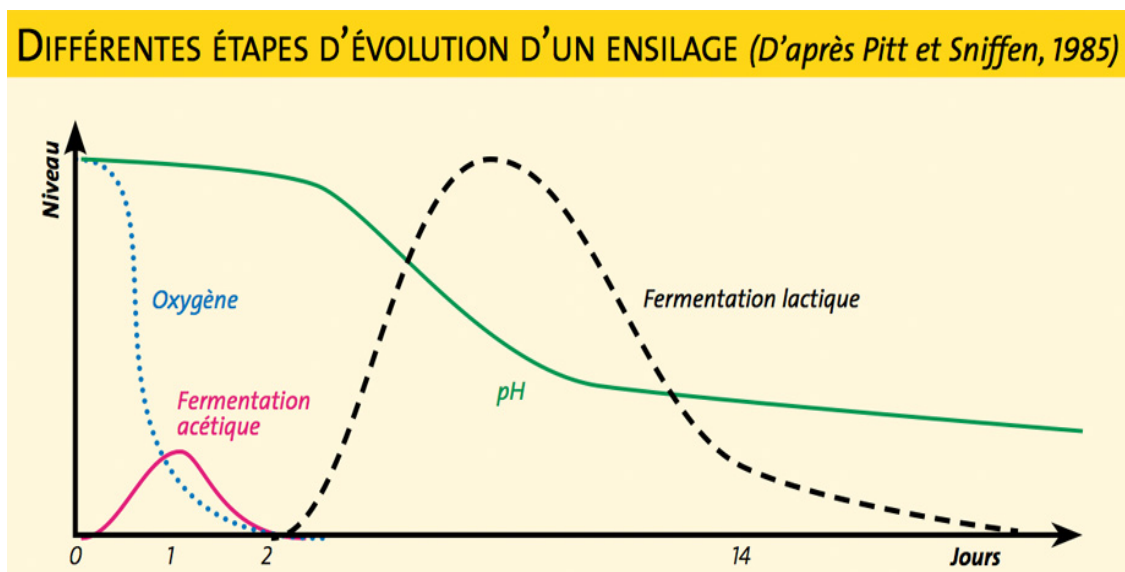


Figura 1. Evolución del ensilaje (Pitt y Sniffen, 1985)

3. Fase estable o de alimentación

Comienza justo después de la apertura del silo. Rápidamente se produce el deterioro de las reacciones de ensilaje, esto provoca la aparición de moho y de bacterias no deseables. Dependiendo del silo, las pérdidas son más o menos abundantes. Cuanto

mayor sea el área de exposición del silo, las pérdidas serán más abundantes. Hoy en día, se utiliza silos en formato bolsa, ya que las pérdidas son considerablemente inferiores y esto proporcionará la ración diaria que necesitan los animales. De esta forma nos aseguramos que los animales comen exactamente la cantidad que queremos y que no se producen grandes pérdidas por estar expuestos a condiciones aerobias mucho tiempo. (Barnett, 1951).

En cuanto al deterioro sufrido por el ensilaje, cabe decir que este 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. La segunda etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aerobios, también facultativos, como mohos y enterobacterias.

Es cierto que en el ensilaje debe producirse ácido acético en baja cantidad, pero la diferencia está en que en un buen ensilaje eso ocurre sólo al inicio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior de la masa ensilada.

Valor nutricional del ensilaje

La masa de ensilaje se compone de varios componentes que varían dependiendo de factores tales como el tipo de ensilado, la forma de la cosecha y las condiciones climáticas.

El primero de estos componentes es la materia seca, con la que también podemos saber la cantidad de humedad que hay en el forraje. La materia seca es importante porque controla la calidad del proceso de fermentación. Bajos contenidos en humedad se asocian generalmente con plantas más ancianas, que pueden alterar el contenido de la digestibilidad de los alimentos y la energía que estos son capaces de transmitir de manera significativa. (<http://sian.inia.gob.ve> “evaluación de la calidad de los ensilajes”).

El valor óptimo de materia seca es de entre el 30 y el 35% de la misma sobre el 100% de la masa de ensilaje.

Además de la materia seca, el ensilado también está compuesto por:

El ADF (Fibra de Detergente Ácido) representa el contenido de celulosa, lignina y cenizas de la muestra. Está estrechamente asociada con la fracción no digerible de

alimentación y es un factor muy importante en el cálculo del valor energético de los alimentos. (Logan y Lister, 1971). Cuando aumenta el contenido de ADF, hay una disminución de la digestibilidad de los alimentos y la energía que contiene.

El NDF (Fibra de Detergente Neutro) es la fracción orgánica que no es digerible o lentamente digerible y está contenida principalmente en las paredes celulares de las plantas que se usan para el ensilaje. El NDF proporciona una mejor estimación del contenido total de fibra y está estrechamente ligado al consumo de alimentos. Cuanto más NDF, los animales consumirán menos cantidad de forraje. (Del Pozo, 1971).

El dNDF nos da la cantidad de NDF digerido *in vitro* después de 24, 30 o 48 horas. La disminución del dNDF tras 48 horas es debida por lo general a un contenido más abundante en lignina en la fracción de NDF. (<http://adagrocolombia.blogspot.com.es/>).

El forraje también contiene lípidos y minerales como el fósforo, magnesio, potasio y calcio en cantidades más pequeñas.

Tipos de ensilaje

El ensilaje es guardado en una estructura llamada silo. La capacidad del silo se determina de acuerdo a las necesidades (el tamaño del paquete y el número de porciones). (Langston, *et al.*, 1958). El silo no es más que un depósito o construcción donde se almacenan o se guardan granos, pastos o forrajes picados con el fin de producir la fermentación anaeróbica de la masa forrajera. Los silos para pastos pueden ser elevados sobre la superficie del suelo o pueden ser subterráneos, los hay temporales o transitorios y fijos o permanentes.

Existen diferentes tipos de silo se pueden usar para almacenar el ensilaje:

- SILOS BUNKER: Son aquellos que se construyen sobre el nivel del suelo, cuyas paredes y piso pueden ser de concreto o cualquier material de la región. También se les llama silos horizontales.
- SILOS DE MONTON: Son aquellos que no tienen paredes, se les llama también silo de pila, en esta clase de silo se amontona el forraje picado y se tapa. Es un silo muy económico, pero presenta altos porcentajes de pérdidas.

Los silos horizontales (bunker y montón) deben construirse en sitios de piso firme, incluir en sus costos la adquisición de un plástico calibre 7 u 8 para proteger la masa forrajera del contacto con el suelo, aire, sol y agua, y además protegerlos de la entrada de animales.

- SILOS DE BOLSA: Se les conoce también como microsilos, presentan pérdidas reducidas y facilitan las labores de alimentación, almacenamiento y transporte; pueden utilizarse bolsas con capacidad para 50 o 60 kg. Es una práctica muy utilizada para el pequeño productor, especialmente para lecherías donde son pocas las áreas sembradas en pastos y existan bancos de proteína. Para proteger la bolsa es necesario introducir ésta en bolsas de polipropileno (empaques de abonos y concentrados).
- SILOS EN CANECAS Y TANQUES: Son aquellos donde se utilizan canecas plásticas con capacidad para 200 litros y tanques de 500 y 1.000 litros. Son económicos (una sola inversión) y facilita el llenado y apisonado del forraje, son novedosos y puede resultar una buena alternativa para el pequeño productor. (Pérez, 1969).

La cantidad y el número de factores que intervienen en la calidad de los ensilajes son muy grandes, por lo que es imposible saber con precisión, sin un análisis de laboratorio, todos los componentes y la cantidad en la que afectan. Uno de los problemas más comunes del silo son las fermentaciones defectuosas que causan malos olores, disminución de la calidad del ensilaje y el valor nutritivo. El ácido butírico es el principal responsable de algunos de estos problemas.

LOS ENSILAJES BUTÍRICOS

La proporción de dieta de forraje de las vacas lecheras puede variar fácilmente de entre el 40 al 60%. Estos forrajes se conservan en su mayoría en forma de ensilaje. Por razones económicas, la optimización de las dietas basadas en forraje es de suma importancia. Para una digestibilidad comparable, las diferencias de consumo de ensilaje están relacionadas con su estado de conservación. (Mannetje, 2001). En la práctica, los ensilajes mal conservados se relacionan principalmente con ensilajes butíricos, aunque la falta de estabilidad aeróbica (ensilado recalentado) puede aportar también problemas de ingestión de los animales. En la figura que se muestra a continuación se aprecia la

Calidad nutricional del ensilado almacenado bajo distintas condiciones climáticas –Grado en Ingeniería de las Industrias Agroalimentarias

diferencia existente en cuanto a apariencia entre un forraje bien conservado y otro en un estado de pudrición avanzado, si bien las mayores diferencias entre uno y otro se hallan en su estructura interna.



Figura2. Ensilaje en buen estado de salud (www.ranchosonido.mx)

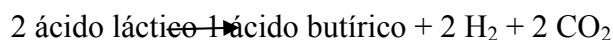
En la industria quesera se registran pérdidas significativas en ciertos tipos de queso debido a la hinchazón tardía de los quesos. El problema se origina con la contaminación de la leche cruda mediante esporas de *Clostridium*. Varios estudios han demostrado que la contaminación de la leche cruda por clostridios está estrechamente relacionada con el uso de ensilaje para alimentar los rebaños. La fermentación butírica no sólo interfiere con la fermentación láctica del ensilaje y de los quesos, sino que también es responsable de una abundante producción de gas, lo que causa en los quesos duros y semiduros el defecto conocido como "soplado tardío", común en quesos Emmental, Grana, Gouda y Parmesano. (Fernández, 1999). Un "ensilaje clostridial" típico mostrará un alto contenido de ácido butírico (más de 5 g/kg de MS), un pH alto (>5 en ensilajes con bajo contenido de MS), 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, puesto que tanto el desarrollo de enterobacterias como de clostridios se inhibe con valores bajos de pH. (Quiroz, 2009).

La mejora microbiológica de los ensilajes es por tanto un reto importante para evitar los problemas de contaminación causados en la leche que posteriormente derivan en pérdidas para la industria quesera. Sin embargo, los tipos de clostridios involucrados en problemas de hinchazón del queso son generalmente seguros para los seres humanos.

Características de los ensilajes butíricos

La fermentación butírica es una fermentación de las llamadas secundarias, que como ya hemos comentado anteriormente es realizada por las bacterias del género *Clostridium*. Estas bacterias son anaerobias estrictas, lo que quiere decir que su crecimiento se lleva a cabo en ausencia de oxígeno. (Titterton y Bareeba, 2006). Al comienzo, cuando entran en los silos, estas bacterias que provienen del suelo se encuentran como endosporas. Para que se produzca desarrollo, la espora debe germinar para dar a luz a un microorganismo que, a su vez, se multiplica para aumentar la población. Cuando hay presencia de oxígeno, su crecimiento se detiene y los microorganismos esporulan para asegurar su supervivencia. Esto es lo que puede observarse en los silos que tienen fugas. Cuando el número de esporas en la salida del silo es mayor que el número a la entrada, es que no ha habido crecimiento.

Existen varios tipos de clostridios que aparecen en los ensilajes: hay microorganismos que realizan una fermentación de carbohidratos solubles, como almidón o pectina, con formación de ácido acético, CO₂ y H₂. Algunas de las bacterias del ácido butírico forman compuestos neutros adicionales como butanol, acetona, isopropanol y pequeñas cantidades de etanol. Otros clostridios pueden crecer en ausencia de carbohidrato fermentable y son responsables de la descomposición putrefactiva de compuestos nitrogenados. En este grupo se incluyen la mayor parte de los clostridios patógenos (*C. botulinum*, *C. tetani* y *C. perfringens*). La descomposición anaeróbica de las proteínas produce amoníaco, CO₂, H₂S, ácidos grasos y una variedad de otras sustancias volátiles que, con frecuencia, tienen un olor desagradable. (Demarquilly *et al.*, 1989). La especie de mayor importancia en las lecherías es *Clostridium tyrobutyricum*, un organismo ácido tolerante. Además de poder fermentar carbohidratos, *C. tyrobutyricum* también puede degradar el ácido láctico en ácido butírico, H₂ y CO₂, según la reacción siguiente:



(Stanier *et al.*, 1996).



Figura 3. Aspecto de un ensilaje butírico (ensilados.com).

Efecto de los ensilajes butíricos sobre la palatabilidad

Los ensilajes butíricos están asociados fundamentalmente con forrajes de baja tasa de ensilado (Figura 3). En estas condiciones, el pobre ensilado que se ha llevado a cabo no permite conseguir los valores de pH necesarios para inhibir la acción de las bacterias butíricas en relación con su contenido en materia seca. Este pH se llama también pH de estabilidad anaerobia. (Bethancourt y García, 2009). Un ensilaje butírico típico se caracteriza por un pH superior a 5. Los ensilajes con mayor riesgo de convertirse en ensilajes butíricos son los que poseen una cantidad de materia seca inferior al 30%.

Ciertas cantidades de ácido propiónico, acético y valérico también son detectadas en estos ensilajes. La detección de ácido butírico indica la presencia de clostridios sacarolíticos que, junto con el aumento en el pH, permiten a los clostridios proteolíticos su activación y la fermentación de aminoácidos. (Dulphy y Demarquilly, 1981).

Contaminación de la leche por esporas butíricas

La contaminación de la leche cruda por esporas butíricas tiene su origen en el medio ambiente de la vaca. La higiene en el establo y en el ordeño, son de primordial importancia para evitar las contaminaciones indeseadas. (Dermaquilly *et al.*, 1998). Sin embargo, es prácticamente imposible tener una leche ausente de esporas butíricas en su

totalidad. El nivel de contaminación permitido para la leche cruda depende del tipo de queso, pero en general, podemos hablar de unos niveles en torno a 1.000 esporas/L como estándar máximo. En un estudio de modelización de los procesos de contaminación de la leche, la contaminación de ensilaje resultó ser el factor más importante. Los resultados mostraron que para tener un nivel máximo de contaminación de 1.000 esporas/L en la leche cruda, el número de esporas de *Clostridium* en el ensilaje no debe superar las 1.000 esporas/g ensilaje. (Fernández, 1999).

Estrategias para obtener un ensilaje bien conservado y una buena calidad microbiológica de la leche cruda

Optimizar el ensilado de las plantas: lograr un contenido en materia seca alrededor del 30% cuando el forraje es ensilado en las bolas redondas características, aunque también puede adquirir otras formas. Aumentar el contenido de materia seca mínimo de 5%.

Reducir el inóculo de esporas butíricas que entran en el silo: es necesario para reducir al mínimo la contribución de suelo y otros residuos que contiene un alto número de *Clostridium*. En condiciones no óptimas de fermentación, la adición de algún aditivo de ensilaje podría contemplarse.

Promover el rápido establecimiento de la fermentación láctica: realizar un llenado y cierre rápido del silo. Picar el forraje para liberar los azúcares y realizar el ensilado con el contenido de materia seca recomendado.

Asegurar una buena estabilidad aeróbica: la fermentación láctica debe ser rápida y eficiente. Hay que intentar mantener buenas condiciones de sellado del silo, buena compactación durante el ensilaje, evitar los contenidos de materia seca por encima del 50% y eliminar los ensilajes con presencia de moho.

Una buena higiene en el establo: una buena higiene en el establo es muy importante para evitar contaminaciones futuras a pesar de que estas contaminaciones contribuyen sólo de forma marginal a la contaminación de la leche. Una buena limpieza técnica de la ubre durante el ordeño también es fundamental. (Cañeque, y Sancha 1998).

OBJETIVOS DEL PROYECTO

Partimos de 50 muestras de ensilaje de Isla Reunión ya maceradas y congeladas . En éstas existen diferentes compuestos químicos que se encuentran formando parte del ensilaje macerado, entre estas sustancias están por ejemplo el ácido acético, láctico y como no el butírico, siendo este último el que más nos interesa a nosotros. Se va a llevar a cabo una búsqueda de la cantidad de ácido butírico presente en nuestras muestras. Dichas muestras se encuentran a una temperatura de congelación de -20°C . La determinación de la cantidad de ácido butírico se llevará a cabo por el método CPG (Cromatografía en Fase Gaseosa). A través de este método podremos tener una idea más precisa de la cantidad de butírico presente en las muestras de ensilaje. La CPG es un método de medición muy preciso, pero tiene un pequeño inconveniente y es que se trata de un método de análisis de muestras lento.

Por tanto, el objetivo principal del proyecto es la determinación de la cantidad de ácido butírico en muestras de ensilaje almacenadas. Nuestra segunda misión será el poder calibrar un aparato SPIR (Espectrometría de Infrarrojo Próximo) con el fin de poder en un futuro realizar las mediciones directamente en campo.

Cabe señalar que este estudio se ha realizado debido a que no existen estudios similares realizados previamente. Sí que sabemos que en el ensilaje hay cierta cantidad de ácido butírico y que este es el causante de la putrefacción del mismo, pero el desafío de saber cuánto exactamente y sobre todo el encontrar una manera de medirlo fácilmente son los objetivos que nos marcamos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

50 muestras de forraje de las granjas de Isla Reunión se introdujeron en agua y se congelaron. Estas muestras fueron analizadas posteriormente para cuantificar los niveles de ácido butírico que contenían. La mayor parte de las muestras recogidas provenían de las zonas altas de la isla, pues es donde se encuentran la mayor parte de las explotaciones ganaderas. Hay que tener en cuenta que las altas temperaturas que se registran en el litoral no permiten la correcta explotación de los animales.

Cada muestra una vez cortada fue empaquetada en condiciones anaerobias y llevada a un secador donde se eliminaron las pequeñas cantidades de humedad que podrían quedar en el seno del ensilaje. A continuación, el material vegetal se maceró en agua y se congelaron las muestras en un congelador situado en el laboratorio donde trabajamos.

Es importante señalar que el porcentaje de materia seca (MS) de cada muestra analizada era conocido previamente, ya que fue medido en el momento de la recolección del forraje en el campo.

Las muestras se encontraban en tubos de ensayo similares a los que se muestran en la *figura 4*, diluidas en agua.

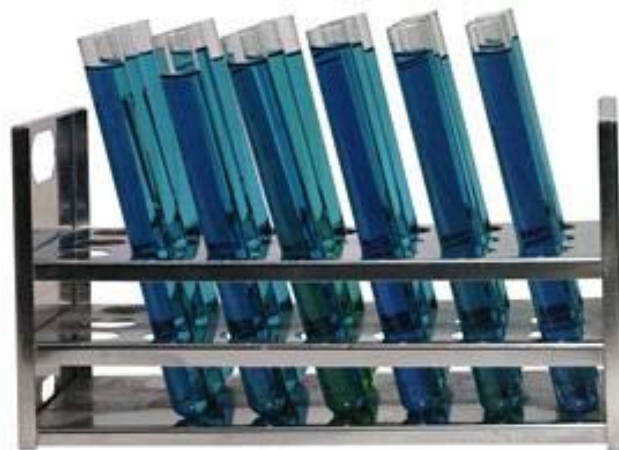


Figura 4. Muestras congeladas de ensilaje.

Método

La extracción del ácido butírico de las muestras sigue el proceso siguiente:

Después de la descongelación de las muestras maceradas durante 15 min a 40°C en una estufa (*figura 5*), se lleva a cabo una agitación para la homogeneización de todos sus componentes durante 1 min con un agitador como el que se muestra en la *figura 6*, tras lo cual se produce la transferencia del ácido butírico a una fase éter / hexano (50/50, V/V) a una velocidad de 1 mL de la muestra macerada por cada 2 mL de disolvente (fase éter / hexano) durante 6 min.



Figura 5. Descongelación de las muestras de ensilaje.



Figura 6. Agitación de las muestras para su homogeneización.

Calidad nutricional del ensilado almacenado bajo distintas condiciones climáticas –Grado en Ingeniería de las Industrias Agroalimentarias

A continuación, 10 μL de la fase éter/hexano son inyectados en un Hewlett Packard 5890 CPG (*figura 7*). La cromatografía se lleva a cabo en una columna polar DB-Wax 123 a 1.062 de 30 metros de largo, 0,25 mm de ID y 0.25 μm utilizando el helio como gas a 25 psi y 125°C durante 8 min. La inyección tiene una relación de división de 3% a 250°C de ácido butírico y es analizada por un detector de ionización de llama a 270°C.

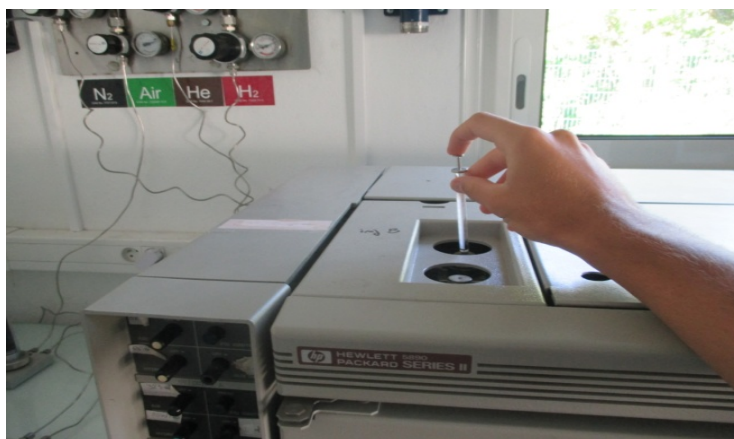


Figura 7. Inyección (10 μL) de la mezcla muestra-fase éter/hexano.

Las muestras se compararán con un intervalo de referencia para calcular la concentración de ácido butírico.

Es importante tener en cuenta que siempre se debe utilizar el mismo método de lectura, es decir, que el tiempo de análisis de la muestra en la CPG debe ser el mismo para todas las muestras. Una variación en el tiempo de lectura alteraría los resultados de concentración de ácido butírico. Nosotros hemos elegido un tiempo de lectura de la CPG de 30 segundos.

También tenemos que tener en cuenta el correcto uso de la CPG, ya que se trata de un equipo costoso y delicado, especialmente la columna responsable de las mediciones que se va a calentar hasta los 300°C. El esquema que resume la actuación de la CPG es el siguiente (Figura 8):

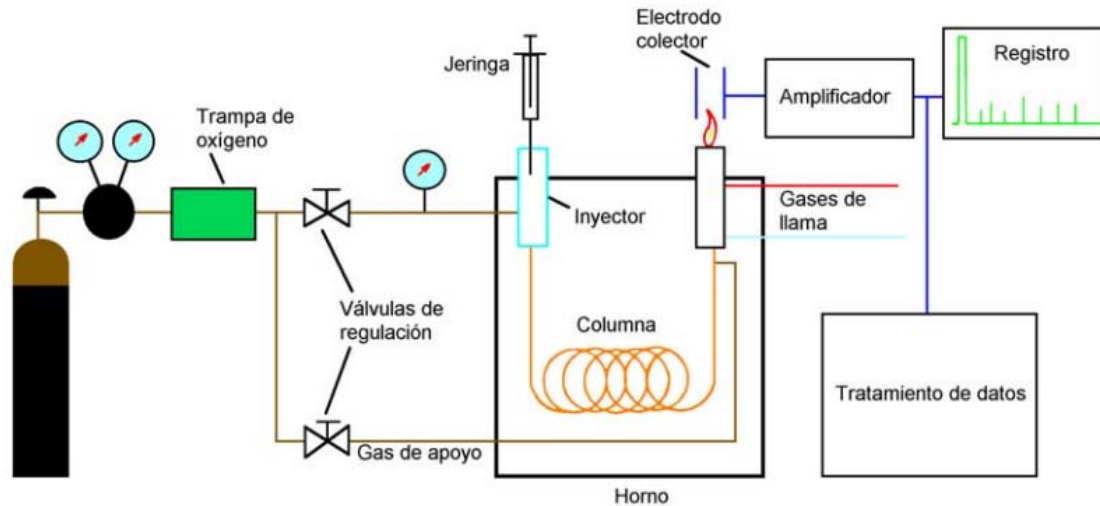


Figura 8. Esquema de un cromatógrafo de gases (<http://www.mncn.csic.es>).

Los tres gases empleados en nuestra medición han sido: oxígeno, nitrógeno y como gas inerte el helio. Es preciso abrir la toma de entrada de los gases antes de encender la CPG, ya que el calentamiento de la columna podría hacer que esta se dilatase y rompiese. En el registro se medirá el área ocupada por los picos obtenidos y se comparará con la gama patrón que previamente hemos calculado, calculando de esta forma la cantidad de ácido butírico de cada muestra. Se realizarán tres inyecciones para cada muestra para reducir la posibilidad de error y obtener un valor más preciso.

RESULTADOS

Resultados CPG

Inmediatamente después de la inyección, la CPG comienza a analizar los diferentes componentes que forman la mezcla analizada (ensilaje). El momento más importante es el momento de la inyección, ya que el dispositivo es muy sensible y si no se realizan al mismo tiempo todas las inyecciones se podrá inducir al error. Un tiempo de retardo de 2-3 segundos entre una inyección y otra puede conllevar diferencias notables en las áreas a la hora de los registros, alterando los resultados. Por tanto, es de vital importancia llevar a cabo el proceso de preparación de las muestras y de inyección de manera sistemática.

En primer lugar, como hemos dicho anteriormente, se realizará una gama patrón con éter, hexano y ácido butírico puro que nos permitirá determinar después de la concentración de ácido butírico de cada muestra. El ácido butírico es muy volátil por lo que trabajaremos siempre con hielo cerca, además posee un fuerte olor similar al de la fermentación del queso por lo que trabajaremos bajo el extractor del laboratorio.

Para analizar las muestras se optó por el método *8M ácido butírico*, ya que no se trata de un método muy largo y permite analizar varias muestras cada día. La CPG puede analizar las muestras en distintos tiempos que podemos elegir nosotros, el método *8M* nos es más que el análisis de cada muestra que inyectamos durante un tiempo de 8 minutos, tal y como hemos señalado en el apartado de materiales anteriormente. El tiempo de retención del ácido butírico tiene pequeñas variaciones dependiendo de la muestra y en función de la concentración de ácido butírico, agua e impurezas de cada muestra, pero normalmente se sitúa entre 4.020 y 4.080 minutos.

Cálculo de los datos

- **Cálculo de la gama patrón**

El cálculo de la gama patrón recta de calibración es necesario para poder calcular después la concentración de ácido butírico en nuestras muestras de ensilaje. Para determinarla haremos varias diluciones a partir de una solución madre (SM).

A partir de la densidad de ácido butírico ($d=0,0964$ g/mL), se calcula la concentración de nuestra MS:

$$[SM]=\frac{5 \times 0,964}{2005} = 0,002404 \mu\text{g}/\mu\text{L} = 2,404 \mu\text{g}/\text{ml}^{(\text{Ec.1})}$$

Una vez que tenemos la concentración de la solución madre, entonces comenzamos las diluciones:

S1: MS (50 L) + éter / hexano (50 μL)

Concentración [S1] = $2,40/2 = 1,2 \mu\text{g} / \text{mL}$

S2: S1 (50 μL) + éter / hexano (50 μL)

Concentración [S2] = $1,2 / 2 = 0,6 \mu\text{g} / \text{mL}$

S3: MS (50 μL) + éter / hexano (2 mL)

Concentración [S3] = $2,40 / 4\text{L} = 0,058 \mu\text{g} / \text{mL}$

S4: S3 (100 μL) + éter / hexano (2 mL)

Concentración [S3] = $0058/2\text{L} = 00,002787 \mu\text{g}/\text{mL}$

S5: S3 (80 μL) + éter/hexano (2 mL)

Concentración [S3] = $0058/26 = 0,002251 \mu\text{g}/\text{mL}$

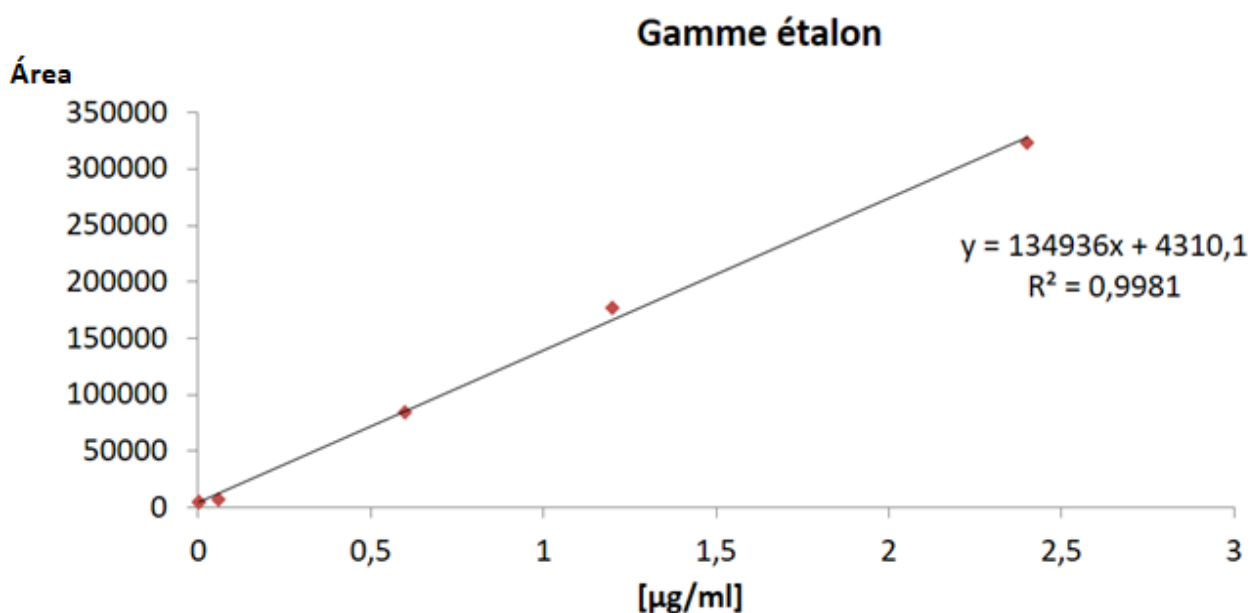


Figura 9. Representación de la gama patrón.

- **Determinación de la eficiencia de la extracción**

Este cálculo se lleva a cabo para determinar la cantidad de ácido butírico que realmente estamos sacando de cada muestra, ya que deseamos conocer si la cantidad que obtenemos es realmente la que posee la muestra al 100%. Para llevar a cabo la determinación de la eficiencia de la extracción, se preparará un estándar externo, preparado con una concentración similar a la concentración de ácido butírico que poseen nuestras muestras de ensilaje. Para conseguir dicha concentración, se diluyó sesenta veces la concentración de la SM anteriormente citada:

SM (100µL) + Agua destilada (5.900µ l) = E.E (Estándar externo)



Éter/Hexano (2 mL) + EI (1 mL)



Recuperación de la fase éter



Inyección (10 µL)

Concentración del estándar externo:

$$[E. E] = \frac{2,40 \mu g/mL}{60} = 0,04 \mu g/mL^{(Ec.2)}$$

El estándar externo no es más que una “falsa muestra” preparada por nosotros de manera artificial. Es decir, con ácido butírico puro y sabiendo la concentración media en ácido butírico de nuestras muestras (es obvio que este estándar externo deberá prepararse una vez hayamos hecho las inyecciones de todas las muestras y sepamos la concentración aproximada de ác. butírico presente en los ensilajes tratados), diluimos hasta alcanzar la concentración deseada y lo mezclamos con la fase éter/hexano tal y como se hacemos con todas las muestras. De esta forma vamos a obtener la “falsa muestra” que utilizaremos para saber el porcentaje de ác. butírico que realmente sacamos.

Después de las inyecciones, obtendremos las áreas correspondientes proporcionadas por la CPG en el registro. Una vez que tengamos los valores de las áreas correspondientes, podremos comparar el área obtenida con la gama patrón con el área obtenida del estándar externo, calculando a continuación el porcentaje de extracción de ácido butírico (eficiencia):

$$\text{Área 1 (gama patrón)} = 9.707$$

$$\text{Área 2 (estándar externo)} = 6.365$$

Por lo tanto, el porcentaje de extracción será:

$$\% \text{ de extracción} = \frac{6,365 \times 100}{9,707} = 65\%^{(Ec. 3)}$$

- **Cálculo de la masa de ácido butírico (M1) en las muestras de ensilaje en µg/500mL**

Para determinar la masa de ensilaje (M1) hemos utilizado la siguiente ecuación:

$$M1 = \frac{C \times 400 (Ec.4)}{V}$$

C = concentración real de las muestras en $\mu\text{g/mL}$

V = volumen de la fase éter/hexano

Volumen de maceración de las muestras a analizar = 400 mL

- **Cálculo de la masa de ácido butírico (M2) en las muestras de ensilaje en $\mu\text{g/gramos de materia fresca}$**

A partir del valor de la masa de ácido butírico obtenido en el apartado anterior (M1), podemos determinar la cantidad de ácido butírico por gramos de materia fresca:

$$M2 = \frac{M1 (Ec.5)}{100}$$

- **Cálculo de la masa de ácido butírico (M3) en las muestras de ensilaje en $\mu\text{g/gramos de materia seca}$**

Con el valor de M2 y el porcentaje de materia seca de cada muestra, se puede calcular la masa de ácido butírico por gramo de materia seca, que es realmente el valor más significativo y que más nos interesa:

$$M3 = \frac{M2 \times 100 (Ec.6)}{\%MS}$$

%MS = valor de la cantidad de materia seca de cada muestra de ensilaje

Quantité d'acid butyrique par pourcentage de matière sèche

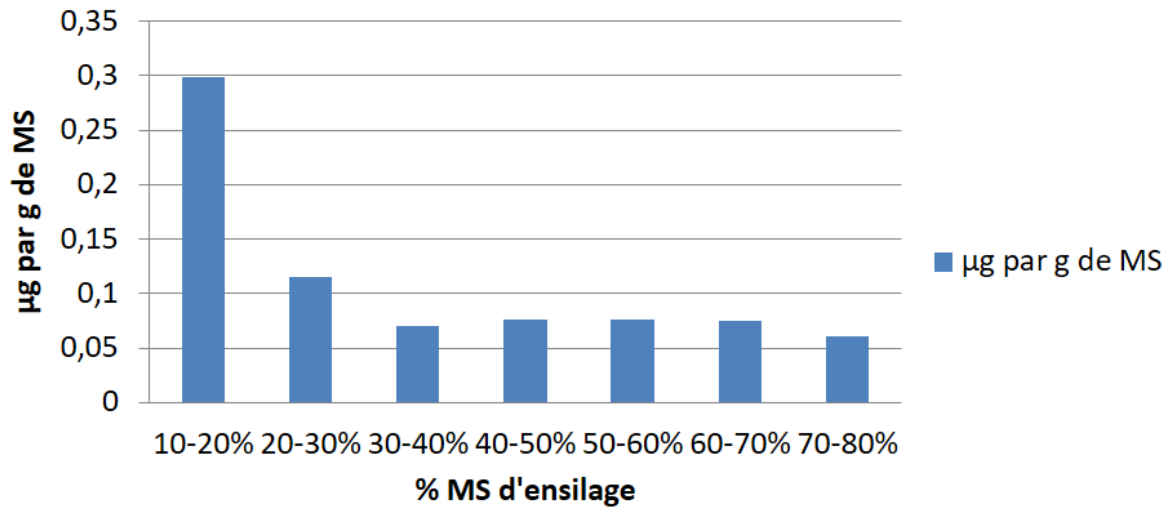


Figura 10. Cantidad de ácido butírico en relación al porcentaje de materia seca.

A continuación se muestran en una tabla (*Tabla 1. Tabla de resultados*) resumen con los cálculos obtenidos de las 50 muestras de ensilaje estudiadas:

Tabla1. Resultados obtenidos de la concentración de ensilaje de cada muestra

| | Concentración µg/mL(2mL) | Rdto de la extracción | Concentración real µg/mL (2mL) | Concentración µg/mL (500mL) | Masa de ensilaje (g) | Volumen de maceración (mL) | Concentración µg/gMF | % MS | Concentración µg/gMS |
|--------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------|-------------------------|
| F7011 | 0,00834 | 65% | 0,01283 | 3,20769 | 5,00 | 400 | 0,0321 | 38,89 | 0,08248 |
| F7012 | 0,00262 | 65% | 0,00403 | 1,00732 | 5,00 | 400 | 0,0101 | 28,97 | 0,03477 |
| F7015 | 0,00591 | 65% | 0,00909 | 2,27287 | 5,00 | 400 | 0,0227 | 36,94 | 0,06153 |
| F7019 | 0,00003 | 65% | 0,00005 | 0,01235 | 5,00 | 400 | 0,0001 | 71,03 | 0,00017 |
| F7022 | 0,0163 | 65% | 0,02508 | 6,26923 | 5,00 | 400 | 0,0627 | 74,29 | 0,08439 |
| F7023 | 0,08747 | 65% | 0,13457 | 33,64231 | 5,00 | 400 | 0,3364 | 63,94 | 0,52615 |
| F7025 | 0,00220 | 65% | 0,00338 | 0,84615 | 5,00 | 400 | 0,0085 | 50 | 0,01692 |
| F7026 | 0,00753 | 65% | 0,01158 | 2,89615 | 5,00 | 400 | 0,0290 | 46,24 | 0,06263 |
| F7028 | 0,00825 | 65% | 0,01269 | 3,17308 | 5,00 | 400 | 0,0317 | 50,49 | 0,06285 |
| F7030 | 0,00175 | 65% | 0,00269 | 0,67308 | 5,00 | 400 | 0,0067 | 25,45 | 0,02645 |
| F7032 | 0,03242 | 65% | 0,04988 | 12,46923 | 5,00 | 400 | 0,1247 | 76,8 | 0,16236 |
| F7033 | 0,01646 | 65% | 0,02532 | 6,33077 | 5,00 | 400 | 0,0633 | 48,54 | 0,13042 |
| F7034 | 0,05099 | 65% | 0,07845 | 19,61154 | 5,00 | 400 | 0,1961 | 54,65 | 0,35886 |
| F7040 | 0,01005 | 65% | 0,01546 | 3,86538 | 5,00 | 400 | 0,0387 | 42,05 | 0,09192 |
| F7043 | 0,02602 | 65% | 0,04003 | 10,00769 | 5,00 | 400 | 0,1001 | 42,24 | 0,23692 |
| F7045 | 0,01333 | 65% | 0,02051 | 5,12692 | 5,00 | 400 | 0,0513 | 47,46 | 0,10803 |
| F7048 | 0,01904 | 65% | 0,02929 | 7,32308 | 5,00 | 400 | 0,0732 | 78,79 | 0,09294 |
| F7050 | 0,01621 | 65% | 0,02494 | 6,23462 | 5,00 | 400 | 0,0623 | 67,38 | 0,09253 |
| F7051 | 0,00399 | 65% | 0,00614 | 1,53462 | 5,00 | 400 | 0,0153 | 28,7 | 0,05347 |
| F7052 | 0,00003 | 65% | 0,00005 | 0,01292 | 5,00 | 400 | 0,0001 | 50 | 0,00026 |
| F7053 | 0,02478 | 65% | 0,03812 | 9,53077 | 5,00 | 400 | 0,0953 | 63,16 | 0,15090 |
| F7054 | 0,02852 | 65% | 0,04388 | 10,96923 | 5,00 | 400 | 0,1097 | 52,33 | 0,20962 |
| F7057 | 0,01405 | 65% | 0,02162 | 5,40385 | 5,00 | 400 | 0,0540 | 49,27 | 0,10968 |
| F7059 | 0,00232 | 65% | 0,00357 | 0,89231 | 5,00 | 400 | 0,0089 | 63,97 | 0,01395 |
| F7060 | 0,0005 | 65% | 0,00077 | 0,19231 | 5,00 | 400 | 0,0019 | 76,92 | 0,00250 |
| F7074 | 0,00545 | 65% | 0,00838 | 2,09615 | 5,00 | 400 | 0,0210 | 36,71 | 0,05710 |
| F7086 | 0,02467 | 65% | 0,03795 | 9,48846 | 5,00 | 400 | 0,0949 | 27,95 | 0,33948 |

Calidad nutricional del ensilado almacenado bajo distintas condiciones climáticas –Grado en Ingeniería de las Industrias Agroalimentarias

| Muestra | Concentración $\mu\text{g/mL}$ (2mL) | Rdto de la extracción | Concentración real $\mu\text{g/mL}$ (2mL) | Concentración $\mu\text{g/mL}$ (500mL) | Masa de ensilaje (g) | Volumen de maceración (mL) | Concentración $\mu\text{g/gMF}$ | % MS | Concentración $\mu\text{g/gMS}$ |
|--------------|--------------------------------------|-----------------------|---|--|----------------------|----------------------------|---------------------------------|-------|---------------------------------|
| F7088 | 0,0126 | 65% | 0,01938 | 4,84615 | 5,00 | 400 | 0,0485 | 22,17 | 0,21859 |
| F7089 | 0,01592 | 65% | 0,02449 | 6,12308 | 5,00 | 400 | 0,0612 | 27,29 | 0,22437 |
| F7093 | 0,01765 | 65% | 0,02715 | 6,78846 | 5,00 | 400 | 0,0679 | 63,5 | 0,10690 |
| F7096 | 0,00921 | 65% | 0,01417 | 3,54231 | 5,00 | 400 | 0,0354 | 67,39 | 0,05256 |
| F7097 | 0,02067 | 65% | 0,03180 | 7,95000 | 5,00 | 400 | 0,0795 | 47,74 | 0,16653 |
| F7099 | 0,01947 | 65% | 0,02995 | 7,48846 | 5,00 | 400 | 0,0749 | 63,86 | 0,11726 |
| F7104 | 0,01383 | 65% | 0,02128 | 5,31923 | 5,00 | 400 | 0,0532 | 19,69 | 0,27015 |
| F7106 | 0,01621 | 65% | 0,02494 | 6,23462 | 5,00 | 400 | 0,0623 | 35,01 | 0,17808 |
| F7108 | 0,01302 | 65% | 0,02003 | 5,00769 | 5,00 | 400 | 0,0501 | 54,08 | 0,09260 |
| F7111 | 0,01077 | 65% | 0,01657 | 4,14231 | 5,00 | 400 | 0,0414 | 43,84 | 0,09449 |
| F7114 | 0,00115 | 65% | 0,00177 | 0,44231 | 5,00 | 400 | 0,0044 | 29,32 | 0,01509 |
| F7115 | 0,00704 | 65% | 0,01083 | 2,70769 | 5,00 | 400 | 0,0271 | 26,27 | 0,10307 |
| F7117 | 0,01273 | 65% | 0,01958 | 4,89615 | 5,00 | 400 | 0,0490 | 46,11 | 0,10618 |
| F7124 | 0,01538 | 65% | 0,02366 | 5,91538 | 5,00 | 400 | 0,0592 | 18,4 | 0,32149 |
| F7126 | 0,00892 | 65% | 0,01372 | 3,43077 | 5,00 | 400 | 0,0343 | 17,49 | 0,19616 |
| F7127 | 0,01058 | 65% | 0,01628 | 4,06923 | 5,00 | 400 | 0,0407 | 15,66 | 0,25985 |
| F7128 | 0,03011 | 65% | 0,04632 | 11,58077 | 5,00 | 400 | 0,1158 | 18,01 | 0,64302 |
| F7129 | 0,01331 | 65% | 0,02048 | 5,11923 | 5,00 | 400 | 0,0512 | 26,94 | 0,19002 |
| F7133 | 0,00545 | 65% | 0,00838 | 2,09615 | 5,00 | 400 | 0,0210 | 36,33 | 0,05770 |
| F7139 | 0,02679 | 65% | 0,04122 | 10,30385 | 5,00 | 400 | 0,1030 | 20,13 | 0,51187 |
| F7140 | 0,02012 | 65% | 0,03095 | 7,73846 | 5,00 | 400 | 0,0774 | 63,23 | 0,12239 |
| F7144 | 0,00509 | 65% | 0,00783 | 1,95769 | 5,00 | 400 | 0,0196 | 16,97 | 0,11536 |
| F7148 | 0,02227 | 65% | 0,03426 | 8,56538 | 5,00 | 400 | 0,0857 | 70,72 | 0,12112 |

Los datos expuestos en la *Tabla 1* resumen los cálculos realizados para saber finalmente la concentración de ácido butírico en $\mu\text{g/g MS}$, que es lo que nos interesa conocer.

Los cálculos utilizados son los descritos anteriormente. M1, M2 y M3 son realizados con sus ecuaciones correspondientes.

DISCUSION DE RESULTADOS

Tras exponer los resultados en el apartado anterior, es momento de llevar a cabo la interpretación de los mismos. Vistos los datos obtenidos, podemos decir en primer lugar, que hay una gran cantidad de nuestras muestras que se encuentran deterioradas a causa de un mal proceso de secado (restos de humedad) o se ha llevado mal la fase de maceración, ya que la disolución en agua ha ocasionado que las muestras estén muy diluidas y la extracción de los componentes del ensilaje sea más complicada y en menor cantidad. Las pérdidas pueden ascender a entre el 12% y el 15% con una buena fermentación, y mucho más si ha tenido lugar una mala fermentación. Como ya hemos comentado anteriormente, la cantidad óptima de materia seca para el ensilaje es de entre un 30 y un 35%. Un contenido de materia seca de este orden estimula la fermentación del ácido láctico, reduce la acidez del ensilaje y produce la inhibición completa de la fermentación butírica. (Givens, 1986). Pero incluso si aceptamos como buenos valores entre de materia seca comprendidos entre 25 y 40%, hay muchas muestras que son de mala calidad.

Hay que evitar contenidos en materia seca superiores al 50%, ya que estos porcentajes corresponden a plantas con más edad y hacen mucho más difícil el conseguir de manera rápida las condiciones anaeróbicas deseadas. Dichos porcentajes pueden cambiar el contenido de la digestibilidad y la energía del forraje ya que los ensilajes butíricos son ensilajes que tienen menor contenido de sólidos, es decir, poseen una gran cantidad de humedad. (Elizalde, *et al.*, 1995).

En nuestro caso y hablando de manera general, la mayoría de las muestras poseen demasiada cantidad de materia seca, por lo tanto, estas muestras no tienen una gran cantidad de ácido butírico (*Figura 10*). De tal forma que es muy importante realizar las medidas de manera muy rigurosa ya que con tan poca cantidad de ácido butírico los resultados en el registro pueden variar por pequeños detalles.

Podemos observar, en relación con los resultados obtenidos en la *Figura 10*, que la cantidad de ácido butírico disminuye más de la mitad entre los valores del 10-20% de materia seca y los valores que se encuentran entre el 20-30%. Después, la cantidad se estabiliza entre los valores de 40-60% y 60-80%. Podemos decir entonces, que el punto crítico a partir del cual la cantidad de ácido butírico aumenta exponencialmente es entre

25 y 30%, siempre refiriéndonos a que las mayores cantidades de butírico son con porcentajes inferiores a estos porcentajes. Por lo tanto, no vale la pena reducir el porcentaje de materia seca por debajo del 35%. También podemos decir que, a partir de porcentajes de materia seca de 50-55%, no vamos a tener problemas con el ácido butírico ya que sus cantidades serán mínimas. Aunque esto no quita que sí tengamos dificultades de digestibilidad y energía de estos forrajes.

En el silo, el ácido butírico causa pérdidas significativas de materia seca y energía digestible. En los rumiantes, se produce una disminución en la cantidad de consumo de ensilaje y del metabolismo de estos animales durante la noche. (AGUILERA, J.J. 1975). Si el ensilaje es rico en ácido butírico, lo mejor es deshacerse de tanto como sea posible y ello se consigue en la fase de maceración.

Después de obtener los resultados de la CPG. El software nos hace tres picos con cada medida de las muestras: los picos de éter y hexano y el pico de ácido butírico. Los picos se diferencian perfectamente, pero se encuentran muy cerca entre sí, es decir, tienen tiempos de retención muy similares. Pensamos como una posible solución a esto, el realizar una esterificación para que los picos estuviesen más separados entre sí con un tiempo diferente de retención. Pero finalmente decidimos descartar esta opción ya que llevaría mucho tiempo y había que trabajar con compuestos peligrosos..

A continuación, vamos a hablar sobre el proceso de maceración, que es donde pensamos que deben centrarse los esfuerzos para obtener un ensilaje de mayor calidad:

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. En el producto sólido (materia seca) hay una serie de compuestos que son solubles en el agente de extracción, que normalmente y en nuestro caso es el agua. (Rojas *et al.*, 1999). Por lo tanto, podemos extraer ciertos principios activos o nutrientes que se encuentran en las muestras.

Cuando empezamos a hacer las inyecciones de las muestras, éstas ya se encontraban maceradas en agua, pero esta maceración en agua provoca que el ácido butírico esté demasiado diluido, lo que hace más complicada su extracción. Pensamos que para conseguir una mejor extracción y, por lo tanto, tener un mejor rendimiento, era preferible añadir la muestra seca y recién cortada directamente en la fase éter/hexano. De esta forma el ácido butírico parte directamente de la fase de éter/hexano y se reduce el riesgo de pérdidas por interacción con otros componentes que están en la maceración.

Si seguimos hablando de la maceración, hay un aspecto que puede ser clave y revolucionario en los próximos años para mejorar la calidad nutritiva de los silos y evitar la formación de ensilajes butíricos:

Descubrimos más adelante, gracias a la opinión de Everardo González Padilla (profesor de la Universidad Nacional Autónoma de México) que ha realizado numerosos estudios sobre alimentación animal, que al adicionar melaza de caña o silotracina como aditivos en el momento de ensilar ciertos zacates tropicales, se producía un aumento de la producción de ácido láctico. Este aumento de producción de láctico significa un mejor proceso fermentativo, en tanto que se reducen las cantidades de ácido butírico. Concretamente, la adición de 4% de melaza favoreció en todos los casos la producción de ácido láctico, lo cual es muy deseable; en tanto que los demás aditivos no mostraron ningún efecto en este sentido. Esto pone en evidencia la reducida cantidad de azúcares fermentales que contienen los zacates en estudio y la necesidad de adicionar una buena fuente de carbohidratos en el momento de ensilar.

Si bien la adición de la melaza parece la solución más adecuada, no pudimos probarlo en el laboratorio *in situ* con nuestras muestras ya que carecíamos del tiempo necesario. Además, hay que tener en cuenta que, si la cantidad de materia seca es la adecuada y la fermentación es correcta, no será necesaria la adición de ningún tipo de aditivo. Por tanto, la mejor manera de prevenir la aparición de ensilajes butíricos es realizar correctamente la fase de maceración para que tenga lugar una fermentación óptima.

Silotracina: producto comercial de Comsolmex, preparado a base de bacitracina.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

A nivel del estudio, hay que señalar que será necesario continuar mejorando el proceso de conservación del ensilaje, sobre todo teniendo en cuenta que el principal problema que nos hemos encontrado en nuestras muestras es que éstas poseían una tenencia en materia seca inadecuada para una fermentación óptima. En la Isla Reunión, el proceso de ensilaje debe hacerse con gran cuidado por el alto contenido de humedad del aire. Por tanto, se debe poner toda la atención en el momento del corte del forraje para trasladarlo lo más rápidamente posible a condiciones anaerobias y conservar, de esta forma, la mayor cantidad de nutrientes posibles.

Por otro lado, los resultados obtenidos entre la cantidad de materia seca y la cantidad de ensilaje son correctos ya que existe una relación lineal evidente entre ambos. Pero estos resultados podrían ser más precisos. La medida de la cantidad de ácido butírico por el método CPG es un método que se debe hacer con gran precisión ya que pequeñas variaciones en el tiempo de inyección de las muestras serán después diferencias muy significativas en los resultados. También hay que decir que el aparato CPG empleado obligaba a realizar las inyecciones manualmente, lo que incrementa las posibilidades de error. Existen CPG que son de inyección automática, en las que se realizan mediciones con 15 o 20 muestras, lo que permite mucha más rapidez y mayor precisión en los resultados.

Por último, hay que decir que hablando en términos de perspectivas, una solución posible para resolver la problemática de un ensilaje con alto contenido en ácido butírico, más teniendo en cuenta las condiciones climáticas de Isla Reunión, podría ser la adición de melaza al 4%. Se trata de un producto relativamente barato y de fácil aplicación en la maceración, que se combina perfectamente con el agua y con el éter/hexano. Dicha melaza puede ser de arroz, remolacha o caña, siendo esta última la más recomendable. La adición de la melaza debe hacerse una vez que se produce el corte del silo en el campo y antes de que comience la maceración.

Como último apunte señalar que, además de la melaza, que favorece la formación de ácido láctico, pensamos que, como hemos dicho anteriormente, realizar la maceración directamente en la fase éter/hexano mejoraría mucho el porcentaje de extracción del ácido butírico.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera, G.R. Pastos y Forrajes. Revista de la EEPF Indio Hatuey. Matanzas, Cuba.

Aguilera, J.J. 1975. Ensilado y henificado de zacates y leguminosas tropicales. En: Día del Ganadero, INIP, Centro Experimental Pecuario, Aldama.

Argamentería, A.; Roza de la, B.; Martínez Fernández, A.; Sánchez, L. y Martínez, A., 1997. El ensilado en Asturias. Servicio de Publicaciones del Principado de Asturias. Consejería de Agricultura.

Barnett, A. J. G., 1951. The colorimetric determination of lactic acid in silage, Biochem. Jour. Universidad de Aberdeen, Escocia.

Bethancourt, H.; García L. 2009. Identificación e inoculación de bacterias, uso de aditivos y su efecto en parámetros de calidad del ensilaje. Universidad ISA, Santiago, Chile.

Catchpoole, V.R. 1965. Journal of Agricultural Research. Australia.

Cañeque, V. y Sancha, J. L. 1998. Ensilado de forrajes y su empleo en la alimentación de rumiantes. Madrid, España.

Clarke, S.P., Stone, R. P. 1995. How to handle seepage from farm silos, Factsheet from the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Ontario. Canadá.

Correa, H. 1980. Ensilaje: Boletín Técnico, No. 4, Carnation Genetics, Querétaro, México.

De la Rosa D., B. 2005. El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. Memorias de la IV Jornada de Alimentación Animal. Madrid.

Del Pozo, M. 1971. La alfalfa: su cultivo y aprovechamiento. MundiPrensa, Madrid.

Demarquilly, C., Andrieu, J., Michale-Doreau, B., Sauvant, D. R. Jarrige, John Libbey.1989. Measurement of the nutritive value of feeds. Ruminant nutrition: recommended allowances and feed tables. París, Francia.

Calidad nutricional del ensilado almacenado bajo distintas condiciones climáticas –Grado en Ingeniería de las Industrias Agroalimentarias

Dermaquilly, J., Dulphy, J.P., Andrieu, J.P., 1998. Valeurs nutritive et alimentaire des fourrages selon les techniques de conservation: foin, ensilage, enrubannage. Fourrages, Versailles, Francia.

Dulphy, J. y Demarquilly, C. 1981. Problèmes particuliers aux ensilages. Prévicion de la valeur nutritive des aliments des Ruminants. Versailles, Francia.

Elizalde, H.F. ; Hargreaves, A. y Goic, L. 1995. Evaluación de ensilajes de cereales de grano pequeño sobre la ganancia de peso de toretes. Revista Argentina de Producción Animal. Mar del Plata, Argentina.

Elizalde, H.F. y Menéndez, A.M. 1998. Evaluación de cereales de grano pequeño conservados como ensilaje, sobre la producción de leche de vacas Clavel Alemán. Chillán, Chile.

Fernández, A., 1999. El ensilaje y los procesos fermentativos. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina.

Garcés M., A.M., Berrio R., L., Ruiz A., S., Serna L., J.M. y Builes A., A.F. 2007. Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado.

Givens, D.I. 1986. New methods for predicting the nutritive value of silage. In: Stark, B .A. and Wilkinson, J.M. (Eds.). Developments in Silage. Marlow, Great Britain.

http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf. Fecha de acceso: 22/05/2015

http://www.fenalce.org/arch_public/ensilaje98.pdf “ensilage98.pdf”. Fecha de acceso: 27/05/2015

<http://sian.inia.gob.ve> “evaluación de la calidad de los ensilajes”. Fecha de acceso: 04/04/2015

<http://adagrocolombia.blogspot.com.es/>. Fecha de acceso: 16/05/2015.

Langston, C. W., Herbert Ivian, C. H. Gordon, Cecilia Bouma, H. G. Wiseman, C. G. Melin and L. A. Moore, 1958. Microbiology and chemistry of grass silage. United States Department of Agriculture, Technical bulletin, Suecia.

Logan, V.S., E.E. Lister. 1971 Grass silage for ruminants. Agriculture Canada, Ottawa.

Calidad nutricional del ensilado almacenado bajo distintas condiciones climáticas –Grado en Ingeniería de las Industrias Agroalimentarias

Mannetje, L. 2001. Uso del ensilaje en el trópico privilegiando opciones para pequeños campesinos. Introducción a la conferencia sobre el uso del ensilaje en el trópico, FAO. Roma.

Martínez, A.; Roza, B. de la y Fernández, O., 1998. Nuevas técnicas para determinar la calidad de los ensilados. Tecnología Agroalimentaria. CIATA N.º 2, Madrid.

Pérez, V. 1969. Conservación de pasturas por el método del ensilaje. Circular CIAS, No. 13, Culiacán, México.

Quiroz, M. 2009. Caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forrajero. Universidad de Córdoba, Argentina.

Rojas, G., C.; Catrileo, S. A. y Romero, Y. O. 1997. Ensilaje de cebada en la engorda invernal de novillos Hereford. Agro Sur. Temuco, Chile.

Rojas G., C.; Catrileo S., A. y Zanetti C., M. A. 1999. Uso de cama de broiler como suplemento proteico en raciones de ensilajes de cebada y praderas en la engorda invernal de novillos. Octubre de 1999. Temuco, Chile.

Romero Y., O.; Rojas G., C.; Butendieck B., N. y Hazard T., S. 1999. Producción de materia seca y calidad nutritiva de tres especies de cereales: avena, cebada y triticale para ensilaje. Temuco, Chile.

Roza, B. de la Roza Delgado, 1998. Mantener la calidad del silo una vez abierto. Tecnología Agroalimentaria. CIATA N° 12, Madrid.

S.J.W.H. Oude Elferink*, F. Driehuis, J.C. Gottschal y S.F. Spoelstra, 2003: Institute for Animal Science and Health (ID-DLO) Dept. Microbiology, Groningen State University, Holland.

Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R. 1996. Microbiología. Ed. Reverté, S.A., Barcelona, 750 pp.

Titterton, M.; Bareeba F. 2006. Ensilaje de gramíneas y leguminosas en los trópicos. Harare, Zimbabwe. Kampala, Uganda.

Uach. 1985. Composición de alimentos para el ganado en la zona sur. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción Animal. Valdivia, Chile.

Calidad nutricional del ensilado almacenado bajo distintas condiciones climáticas –Grado en Ingeniería de las Industrias Agroalimentarias

Pitt y Sniffen. 1985. Evolución del ensilaje.