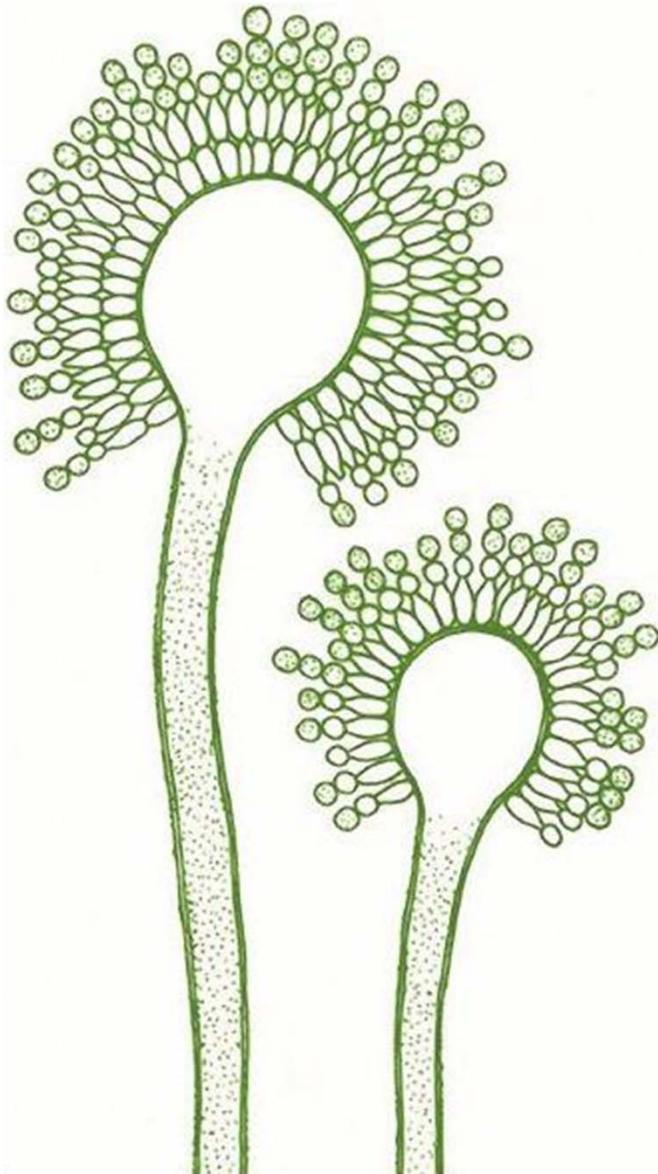


CONTROL BIOLÓGICO DE  
HONGOS TOXIGÉNICOS PRESENTES EN  
FORRAJES CONSERVADOS EMPLEANDO  
CEPAS DE *Streptomyces*



**Bioq. Susana L. Amigot**

**Tesis para optar por el  
título de Dr. en  
Cs. Biológicas**

**Directores:**

Dr. Juan Carlos Basílico  
Dra Cecilia L. Fulgueira

**Lugar de realización:  
CEREMIC- Fac CS. Bioq y  
Farm. UNR  
Cat. MICROBIOLOGÍA-. Fac.  
Ing. Qca . UNL.**

## **Publicaciones**

**New parameters to evaluate forage quality.** Amigot SL, Fulgueira CL, Basílico JC (2006) *Postharvest Biology and Technology* 41, 215-224.

**Forage Quality: Techniques for Testing** Fulgueira CL., Amigot SL., Gaggiotti M, Romero LA, Basílico JC.. **Fresh Produce 1(2)**, 121-131 **2007 Global Science Books** ISSN: 1749-4788

**Quality of forage crops for animal feeds**". Amigot S.L.; Caffaratti S., Fulgueira C.L., Bottai H., Ivancovich J.J., and Basílico J.C. **BioCell** 27(2): 247 (2003)

## **Presentaciones a congresos**

**Búsqueda de cepas de *Streptomyces* antagonistas de hongos toxicogenicos aislados de forrajes conservados.** Amigot SL, Fulgueira CL, Basílico MZ, Basílico JC.. Presentado en:

- III Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. (Córdoba - Argentina 6-10/11/ 2000).
- IV Congreso Rosarino de Biología y XX Reunión Anual SBR. (Rosario – Argentina 4 - 5 /12/2000).

**Evaluación toxico – micológica de silos de sorgo en relación a sus características fermentativas.** Amigot, S.; Caffaratti, S.; Aringoli, E.; Fulgueira, C.y Basílico, J. Presentado en:

- IX Congreso Argentino de Microbiología. (Buenos Aires - Argentina 07 - 11/10/2001).
- I Congreso en Seguridad Alimentaria. (Rosario – Argentina, 17-19/10/2001)

**Cepas de *Streptomyces* como potenciales biocontroladores de hongos toxigénicos aislados de forrajes conservados.** Amigot, S., Basílico, M.L.Z.; Bottai, H.; Leiva, M.; Fulgueira, C. (2001). Presentado en:

- IX Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires 07 al 11/10/01.
- I Congreso en Seguridad Alimentaria. (Rosario – Argentina, 17-19/10/2001)

**Flora fúngica y presencia de micotoxinas como parámetros decisivos en la aceptabilidad de silos de sorgo.** Amigot S.L., Caffaratti S., Aringoli E., Fulgueira C.L., Basílico J.C. Presentado en:

- XXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. (Rosario – Argentina, 26-27/11/2001)

**Micoflora y presencia de aflatoxinas y deoxinivalenol en forrajes conservados para consumo animal.** Amigot, S.; Fulgueira, C.; Basílico, M.Z.; y Basílico, J.C. Presentado en:

- IX Congreso Argentino de Micología y XIX Jornadas Argentinas de Micología. (Resistencia - Argentina 7-9/06/2002)

**Búsqueda de nuevos parámetros para evaluar la calidad de forrajes.** Amigot, S.L.; Caffaratti, S.; Bottai, H.; Basílico, M.L.Z.; Fulgueira, C.L.; Basílico, J.C. Presentado en:

- VI Encuentro Bioquímico (Rosario – Argentina, 19-20/9/2003).

- II Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos (Santa Fe – Argentina, 24-26/9/2003).

**Biocontrol de hongos toxigénicos aislados de forrajes.** Amigot S.L., Basílico M.L.Z., Bottai H., Fulgueira C.L., Basílico J.C. Presentado en:

- II Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos (Santa Fe – Argentina, 24-26/9/2003)
- XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (Rosario – Argentina, 4-5/12/2003)

**Calidad de ensilados para consumo de ganado** Amigot, S.L.; Caffaratti, S.; Fulgueira, C.L.; Bottai, H.; Leiva, M. y Basílico, J.C. (2005). Presentado en:

- I Jornadas de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. (Rosario – Argentina, 20/10/2005)

**Biocontrol de hongos toxigénicos aislados de forrajes.** Amigot, S.L.; Basílico, M.L.Z.; Bottai, H.; Fulgueira, C.L.; Basílico, J.C. Presentado en:

- I Jornadas de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. (Rosario – Argentina, 20/10/2005)

**Estrategias para mejorar la calidad de forrajes.** Amigot, S.L.; Basílico, J.C.; Bottai, H.; Basílico, M.L.Z.; Fulgueira, C.L. Presentado en:

- X Congreso Argentino de Micología y XX Jornadas Argentinas de Micología. (Buenos Aires – Argentina, 22-25/05/2005) pp: 125

**Efecto de potenciales agentes de biocontrol sobre los parámetros químico fermentativos de microsilos experimentales.** Amigot, S.; Gaggiotti, M.; Romero, L., Bottai, H.; Leiva M.; D'Esposito, R.; Basílico, J.C. y Fulgueira, C. Presentado en:

- IX Congreso y XXVII Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. (Rosario – Argentina, 3-5/12/2007). ISSN1668-0154

**Evaluación de la calidad de microsilos de maíz inoculados con potenciales biocontroladores.** Amigot, S.; Fulgueira, C.; Bottai, H.; Leiva, M.; D'Esposito, R.; Gaggiotti, M.; Romero, L.; Vinderola, C.; y Basílico, J.C. Presentado en:

- X Congreso y XXVIII Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario. (Rosario – Argentina, 3-5/12/2008). ISSN1668-0154.

*Índice*

Publicaciones y presentaciones a congresos	I
<b>Índice</b>	III
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VII
Abreviaturas	IX
<b>Resumen</b>	XI
<b>Introducción</b>	1
El ganado y su alimentación	1
Sistemas de conservación	3
Conservación por deshidratación	3
Heno	3
Conservación por fermentación	5
Ensilados	5
Henolajes	8
Embolsado del forraje	9
Calidad de los forrajes	9
¿Qué es la calidad?	9
Evaluación de la calidad	12
La microbiología de los forrajes	18
Flora benéfica	18
Flora indeseable	20
Contaminación bacteriana de los forrajes	20
Enterobacterias	20
Bacilos gram positivos esporulados	21
Bacilos gram positivos no esporulados	22
Contaminación fúngica de los forrajes	23
Levaduras	23
Hongos filamentosos	23
¿Cómo evitar el deterioro de un silo?	34
Uso de inoculantes	34
Otros métodos de preservación	36
Control químico vs. Control biológico	36
Búsqueda de biocontroladores	40
Mecanismos de control biológico	40
<i>Streptomyces</i> como agente de biocontrol	44
Control biológico de hongos toxigénicos	45
<b>Objetivos</b>	48
<b>Materiales y métodos</b>	50
<b>Microorganismos y metodología utilizada</b>	50
Microorganismos utilizados	50
Medios de cultivos y soluciones utilizados	51
<b>Técnicas y bioensayos utilizados</b>	55
Detección de micotoxinas en forrajes	55
Aislamiento, recuento e identificación de la flora fúngica	55
Preparación de suspensiones fúngicas	56
Preparación de inóculos fúngicos	56
Estudio de la capacidad toxigénica de los hongos aislados	56
Producción de aflatoxinas	56

Producción de toxina T-2	57
Producción de zearalenona y deoxinivalenol	57
Producción de fumonisinas	58
Aislamiento e identificación de potenciales biocontroladores	58
Aislamiento, recuento e identificación de <i>Streptomyces</i>	58
Aislamiento, recuento e identificación de cepas BAL	59
Identificación molecular de lactobacilos	59
Preparación de inóculos bacterianos	60
Pruebas de interacción entre hongos toxigénicos/patógenos (HT/HP) y potenciales biocontroladores (PBC)	60
Ensayos de interacción <i>Streptomyces</i> – HT/HP	60
Ensayos de interacción BAL-HT/HP/ <i>Streptomyces</i>	61
Preparación de microsilos experimentales	61
Preparación y selección del mejor carrier para inocular	61
Confección de microsilos experimentales	61
Evaluación química de los forrajes	63
Reactivos y soluciones utilizados	63
Determinación de fibra detergente neutra	64
Determinación de fibra detergente ácida	64
Determinación de nitrógeno total	64
Determinación de proteína bruta	65
Determinación de amoníaco	65
Determinación de nitrógeno insoluble en detergente ácido	65
Determinación del pH	66
Determinación de materia seca	66
<b>Resultados y discusión</b>	<b>67</b>
Evaluación de la calidad de los forrajes	67
Evaluación de los parámetros químico-fermentativos	68
Relación entre el sistema de conservación y la calidad químico-fermentativa de los forrajes	76
Evaluación de los parámetros microbiológicos	77
Recuento e identificación de la flora fúngica	
Capacidad toxigénica de hongos aislados de forrajes. Pruebas in vitro	88
Presencia de micotoxinas en los ensilados	91
Parámetros decisivos para evaluar la calidad de los forrajes. Búsqueda de variables indicadoras de la calidad de un forraje	96
Control biológico de la contaminación fúngica en forrajes	107
Control biológico de hongos toxigénicos <i>in vitro</i>	107
Evaluación de la actividad antagonista de cepas de <i>Streptomyces</i> spp. frente a cepas fúngicas de capacidad toxigénica probada	107
Evaluación de la actividad de cepas de BAL frente a cepas fúngicas de capacidad toxigénica probada y a <i>Streptomyces</i> sp. C/33-6 seleccionado como potencial agente de biocontrol	113
Control biológico de hongos toxigénicos en microsilos experimentales	118
Búsqueda del mejor carrier para inocular los microorganismos	118
Ensayo en microsilos experimentales (ME) de planta entera de maíz	121
Preparación de inóculos	121
Armado de los ME	122
Evaluación de la calidad de los ME	124

Evolución de los parámetros microbiológicos	125
Evolución de los parámetros químico-fermentativos	134
Evaluación de aceptabilidad de los ME	146
<b>Conclusiones</b>	<b>148</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>151</b>
<b>Apéndice</b>	<b>166</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>170</b>

<b>Fig 1:</b> Cuenca láctea de Argentina: Buenos Aires	<b>1</b>
<b>Fig 2:</b> Distribución del ganado por especie en la provincia de Santa Fe	<b>2</b>
<b>Fig 3:</b> Heno. a) Fabricación de rollos para conservación de pasturas con bajo contenido de humedad. b) y c) Almacenamiento a campo de rollos y fardos.	<b>4</b>
<b>Fig 4:</b> Silo puente. a) Estructura del silo previo al llenado. b) Silo lleno y cubierto con plástico protector. c) Apertura del silo puente para la alimentación del ganado	<b>7</b>
<b>Fig 5:</b> Silo bolsa. Banda lateral en posición correcta de llenado de la bolsa (indicada por la flecha).	<b>7</b>
<b>Fig 6:</b> Henolaje. Rollos de forraje húmedo cubiertos con plástico tricapa	<b>8</b>
<b>Fig 7:</b> Acopio a campo de alimentos conservados por henolaje	<b>8</b>
<b>Fig 8:</b> Composición de la pared celular vegetal	<b>15</b>
<b>Fig 9:</b> Composición de un alimento. Relación materia seca- agua	<b>15</b>
<b>Fig 10:</b> Microscopía de fluorescencia confocal con Diacetato de fluoresceína - Bromuro de etidio de conidios.	<b>46</b>
<b>Fig 11:</b> Desarrollo de cepas del género <i>Aspergillus</i> en medio AFPA	<b>55</b>
<b>Fig 12:</b> Esquema para ensayar la actividad biológica de PBC	<b>60</b>
<b>Fig. 13:</b> Evaluación químico-fermentativa de las muestras de forrajes de maíz, sorgo y alfalfa distribuidas como <b>MB/B</b> Muy Buenas / Buenas, <b>R</b> Regulares o <b>M</b> Malas.	<b>75</b>
<b>Fig 14</b> Densidad relativa de aislamientos de levaduras, <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i> en muestras de forrajes	<b>86</b>
<b>Fig 15:</b> Estudio de la capacidad productora de micotoxinas de cepas de <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i> aisladas de forrajes almacenados	<b>90</b>
<b>Fig 16:</b> Distribución de las muestras con presencia de micotoxinas según la matriz	<b>93</b>
<b>Fig 17:</b> Evaluación final como A o Ri de muestras de forrajes	<b>104</b>
<b>Fig 18:</b> Algoritmo de trabajo para evaluar la calidad de un forraje	<b>106</b>
<b>Fig 19:</b> Macromorfología y micromorfología de cepas de <i>Streptomyces</i>	<b>108</b>
<b>Fig 20:</b> Bioensayo empleado para seleccionar cepas de <i>Streptomyces</i> potenciales biocontroladores fúngicos	<b>109</b>
<b>Fig 21:</b> Inhibición producida por las cepas de <i>Streptomyces</i> de mayor actividad antifúngica	<b>112</b>
<b>Fig 22:</b> Bioensayo empleado para seleccionar cepas de BAL potenciales biocontroladores fúngicos.	<b>116</b>
<b>Fig 23:</b> Confección de ME	<b>122</b>
<b>Fig 24:</b> Microsilos experimentales de maíz planta entera dispuestos a campo.	<b>123</b>
<b>Fig 25:</b> Valores observados del recuento de <i>Streptomyces</i> en malas condiciones de almacenamiento	<b>128</b>
<b>Fig 26:</b> Medias de la raíz cuadrada del recuento total de BAL para los distintos tratamientos y condiciones de compactación	<b>129</b>
<b>Fig 27:</b> Medias del logaritmo del recuento total de hongos para los distintos tratamientos y condiciones de compactación.	<b>130</b>
<b>Fig 28:</b> Valores observados del recuento de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en malas condiciones de almacenamiento.	<b>132</b>
<b>Fig 29:</b> Medias del logaritmo de la concentración de DON para	

---

los distintos tratamientos y condiciones de compactación.	<b>133</b>
<b>Fig 30:</b> Valores medios de pH para los distintos tratamientos y condiciones de compactación.	<b>138</b>
<b>Fig 31:</b> Valores medios de %NH <sub>3</sub> /NT para los distintos tratamientos y condiciones de compactación.	<b>139</b>
<b>Fig 32:</b> Valores medios de %MS para los distintos tratamientos y condiciones de compactación.	<b>141</b>
<b>Fig 33:</b> Valores medios de %PB para los distintos tratamientos y condiciones de compactación.	<b>141</b>
<b>Fig 34:</b> Valores medios de %FDN para los distintos tratamientos y condiciones de compactación.	<b>142</b>
<b>Fig 35:</b> Valores medios de %FDA para los distintos tratamientos y condiciones de compactación.	<b>143</b>
<b>Fig 36:</b> Valores medios de %NIDA/NT para los distintos tratamientos y condiciones de conservación.	<b>144</b>

<b>Tabla 1:</b> Evaluación de la aptitud del ensilado en relación al contenido de compuestos proteicos y de azúcares con la matriz.	<b>10</b>
<b>Tabla 2:</b> Características sensoriales y fermentativas que permiten evaluar el tipo de ensilajes	<b>14</b>
<b>Tabla 3:</b> Características de las BAL aisladas de ensilados	<b>19</b>
<b>Tabla 4:</b> Hongos productores de micotoxinas en alimentos.	<b>29</b>
<b>Tabla 5:</b> Tipos de aditivos para ensilaje. Efecto más frecuente	<b>35</b>
<b>Tabla 6:</b> Fungicidas biológicos vs. químicos	<b>39</b>
<b>Tabla 7:</b> Pseudopéptidos activos frente a patógenos de plantas	<b>43</b>
<b>Tabla 8:</b> Microorganismos utilizados	<b>50</b>
<b>Tabla 9:</b> Composición de medios de cultivos y soluciones empleados	<b>51</b>
<b>Tabla 10:</b> Composición de las soluciones empleados para la evaluación química de los forrajes	<b>63</b>
<b>Tabla 11:</b> Distribución de las muestras de forrajes teniendo en cuenta el tipo de matriz y el sistema de conservación	<b>67</b>
<b>Tabla 12a:</b> Parámetros químico-fermentativos en muestras de forrajes de maíz	<b>69</b>
<b>Tabla 12b:</b> Parámetros químico-fermentativos en muestras de forrajes de sorgo	<b>71</b>
<b>Tabla 12c:</b> Parámetros químico-fermentativos en muestras de forrajes de alfalfa	<b>73</b>
<b>Tabla 13a:</b> Evaluación tóxico-micológica de muestras de ensilados de maíz	<b>78</b>
<b>Tabla 13b:</b> Evaluación tóxico-micológica de muestras de ensilados de sorgo	<b>80</b>
<b>Tabla 13c:</b> Evaluación tóxico-micológica de muestras de ensilados de alfalfa	<b>82</b>
<b>Tabla 14:</b> Micoflora aislada de forrajes conservados para consumo animal	<b>84</b>
<b>Tabla 15:</b> Niveles de micotoxinas en las muestras de forrajes	<b>92</b>
<b>Tabla 16a:</b> Evaluación final de las muestras de ensilados de maíz	<b>98</b>
<b>Tabla 16b:</b> Evaluación final de las muestras de ensilados de sorgo	<b>100</b>
<b>Tabla 16c:</b> Evaluación final de las muestras de ensilados de alfalfa	<b>102</b>
<b>Tabla 17:</b> Actividad antifúngica producida por las cepas de <i>Streptomyces</i> frente a hongos toxigénicos	<b>110</b>
<b>Tabla 18:</b> Actividad antifúngica producida por las cepas de BAL frente a los hongos toxigénicos y <i>Streptomyces</i> C/33-6	<b>115</b>
<b>Tabla 19:</b> Recuento total de <i>Aspergillus</i> grupo <i>flavus</i>	<b>119</b>
<b>Tabla 20:</b> Recuento total de <i>Streptomyces</i>	<b>119</b>
<b>Tabla 21:</b> Evaluación microbiológica de la materia prima utilizada en el armado de los ME	<b>125</b>
<b>Tabla 22a:</b> Parámetros microbiológicos en silos conservados a campo durante 45 días con Buenas Condiciones de compactación	<b>126</b>
<b>Tabla 22b:</b> Parámetros microbiológicos en silos conservados a campo durante 45 días con Malas Condiciones de compactación	<b>127</b>
<b>Tabla 23:</b> Comparaciones múltiples según Tukey de la variable Recuento Total de BAL (raíz cuadrada) en buenas condiciones de compactación	<b>129</b>
<b>Tabla 24:</b> Comparaciones múltiples según Tukey de la variable Recuento Total de hongos en buenas y malas condiciones de compactación	<b>131</b>
<b>Tabla 25:</b> Comparaciones múltiples según Tukey de la recuento de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en malas condiciones de compactación	<b>133</b>
<b>Tabla 26:</b> Comparaciones múltiples según Tukey de la variable concentración de DON en malas condiciones de compactación	<b>134</b>
<b>Tabla 27:</b> Evaluación químico-fermentativa de la materia prima utilizada en el armado de los ME	<b>135</b>
<b>Tabla 28a:</b> Parámetros químico-fermentativos de ME conservados a campo durante 45 días con Buenas condiciones de compactación	<b>136</b>

<b>Tabla 28b:</b> Parámetros químico-fermentativos de ME conservados a campo durante 45 días con Malas condiciones de compactación	<b>137</b>
<b>Tabla 29:</b> Comparaciones múltiples según Tukey de la variable %NH <sub>3</sub> /NT en buenas y malas condiciones de compactación	<b>140</b>
<b>Tabla 30a:</b> Evaluación final de la calidad de ME con Buenas condiciones de compactación	<b>146</b>
<b>Tabla 30b:</b> Evaluación final de la calidad de ME con Malas condiciones de compactación	<b>147</b>

AF	Aflatoxinas
AFM <sub>1</sub>	Aflatoxina M <sub>1</sub>
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATCC	American Type Culture Collection
B-G	Grano húmedo almacenado en silo bolsa
B-P	Planta entera almacenada en silo bolsa
Bu-P	Planta entera almacenada en silo puente (bunker)
%Cz	Porcentaje de cenizas
CB	Control Biológico
CAST	Council for Agricultural Science and Technology
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
DAS	Diacetoxiscirpenol
DON	Deoxinivalenol
%DIV/MS	Porcentaje de Digestibilidad in vitro de MS
%FDA	Porcentaje de Fibra detergente ácida
%FDN	Porcentaje de Fibra detergente neutra
%FDNdigestible	Porcentaje de FDN digestible
%FDNef	Porcentaje de Fibra detergente neutra efectiva
%MS	Porcentaje de Materia seca
%NH <sub>3</sub> /NT	Porcentaje de amoníaco en relación con el NT
%NIDA/NT	Nitrógeno insoluble en detergente ácido
%NIDN/NT	Nitrógeno insoluble en detergente neutro
%PB	Porcentaje de proteína bruta
a <sub>w</sub>	Actividad de agua
BAL	Bacterias ácido lácticas
BGN	Bacilos Gram negativos
BGP	Bacilos Gram positivos
Ca	Calcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
EN	Energía neta
G	Gramo
H	Henolaje
H <sub>2</sub>	Hidrógeno
K	Potasio
Kg	Kilogramo
Mg	Magnesio
ME	Microsilos experimentales
N <sub>2</sub>	Nitrógeno
N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
NDT	Nitrógeno digestible total
NH <sub>3</sub>	Amoniaco
NO	Monóxido de nitrogênio
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogênio
NO <sub>3</sub>	Trióxido de nitrogênio
NRRL	Northern Regional Research Laboratory (Culture Collection)
NT	Nitrógeno total
O <sub>2</sub>	Oxígeno
OPS	Organización Panamericana de Salud
OT	Ocratoxinas Totales
OTA	Ocratoxina A

P	Fósforo
Ro	Rollo
SIH	Síndrome Intestinal hemorrágico
SKLP	<i>Streptomyces</i> Killer Like Protein
T-2	Toxina T-2
TFIC	Toxigenic Fungi Inhibitor Compound
HT-2	Toxina HT2
UFC	Unidades formadoras de colonias
VRA	Valor relativo del alimento

*Resumen*

La República Argentina es un país que se ha caracterizado a lo largo del tiempo por su importante producción agrícola-ganadera.

Los sistemas de producción de ganado se basan en el pastoreo directo de los recursos forrajeros suplementado con granos, subproductos de las cosechas, forrajes almacenados por deshidratación (heno) o por fermentación (ensilaje y henolaje) con distintos sistemas de conservación.

La calidad del forraje se refiere a cómo los animales consumen un alimento y a cómo los alimentos se convierten eficientemente en productos animales. Los parámetros que brindan al productor información sobre la calidad de un forraje pueden agruparse en: organolépticos, parámetros que permiten evaluar la composición química, el procesamiento y conservación, la digestión y el contenido de energía del mismo. Los principales parámetros que permiten evaluar tal calidad son: proteína bruta, fibra detergente neutra, fibra detergente ácida, materia seca, pH, nitrógeno amoniacal y nitrógeno insoluble en detergente ácido y en detergente neutro.

El éxito de los procesos de conservación de alimentos depende los microorganismos (benéficos o perjudiciales) que se hallan presentes.

La flora benéfica, constituida principalmente por las bacterias ácido lácticas, asegura un valor apropiado de pH limitando el desarrollo de la flora microbiana no benéfica (*Clostridium*, *E.coli*, otros Bacilos Gram negativos, hongos levaduriformes y/o filamentosos). Algunos géneros fúngicos como *Aspergillus*, *Fusarium*, etc., contaminantes tanto de la materia prima como de los alimentos destinados al consumo animal, cobran especial interés por su capacidad patógena y/o toxigénica.

El estudio de la calidad químico-fermentativa de alimentos (forrajes de maíz, sorgo y alfalfa) destinados al consumo animal de la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe, permitió calificar a las muestras de sorgo y maíz mayoritariamente como regulares y a las de alfalfa como regulares o malas. Además, se observó que el sistema puente no era recomendable para el almacenamiento de los forrajes de sorgo.

Teniendo en cuenta el recuento total de hongos, los ensilados de maíz fueron los más contaminados seguidos por los de alfalfa. Los hongos levaduriformes fueron los de mayor aparición en todos los forrajes. Entre los

hongos filamentosos los posibles toxigénicos fueron los más aislados. Dentro de ellos el género *Aspergillus* fue el que se presentó mayoritariamente en los 3 sustratos siendo *Aspergillus* sección *flavi* los más frecuentes. Cuando se evaluó *in vitro* la toxigenicidad de los aislados se comprobó la capacidad productora de aflatoxinas (AF) por 2 cepas de *Aspergillus* y de fumonisinas por 2 cepas del género *Fusarium*.

En los ensilados de alfalfa y maíz se observó la mayor incidencia de AF y deoxinivalenol (DON) con valores no aceptables para el consumo animal, presentándose mayoritariamente en forma conjunta las dos toxinas. Los valores más altos de DON se presentaron en forrajes de maíz y alfalfa. En los ensilados de sorgo se encontraron las concentraciones más altas de AF.

En base a la evaluación conjunta de las todas las variables estudiadas se pudo concluir que en muchos casos los parámetros químico-fermentativos o toxico-micológicos *per se* resultaron insuficientes para obtener la calificación final de los forrajes. Se diseñó un protocolo de análisis empleando variables indicadoras que permitió evaluar en forma sencilla y confiable la aceptabilidad final de los forrajes.

Teniendo en cuenta el análisis de los parámetros químico-fermentativos y tóxico-micológicos o de sus variables indicadoras la mayoría de las muestras de alfalfa y maíz no resultaron aceptables para el consumo de ganado vacuno, mientras que casi la mitad de los forrajes de sorgo resultaron también riesgosos.

La prevención del deterioro de la calidad debe ser una parte importante de todo programa de conservación de alimentos. El control biológico es una herramienta que permitiría regular la densidad de microorganismos patógenos y/o sus efectos en forma más inocua que el control químico. En la búsqueda de potenciales biocontroladores de hongos toxigénicos fueron seleccionadas una cepa de *Streptomyces* sp., C/33-6 y *Lactobacillus buchneri*, BAL/7.

Fueron diseñados silos experimentales, reproduciendo las condiciones a campo, en los que se inocularon los microorganismos seleccionados como potenciales biocontroladores y una cepa toxigénica de *A. parasiticus*, 5M43.

Las condiciones experimentales no permitieron obtener silos de Buena calidad químico-fermentativa. En buenas condiciones de conservación los ME resultaron de calidad Regular. Las malas condiciones produjeron silos de calidad

químico-fermentativa Mala a excepción de aquellos en los que fue inoculado BAL/7, calificados como Regulares. Todos los ME Regulares fueron aceptables en su evaluación final.

La aceptabilidad final de los ME obtenida a partir del análisis conjunto de todas los parámetros coincidió con la resultante del empleo de las variables indicadoras.

En las condiciones ensayadas *Lactobacillus buchneri* BAL/7 resultó un agente de biocontrol más promisorio que *Streptomyces* sp C/33-6.

## ABSTRACT

Argentina has long been known for its leading role in agricultural and cattle rearing production.

Cattle rearing production systems are based upon the direct grazing of forage resources supplemented with grains, crop by-products, forages stored as hay through dehydration or as silage and haylage through fermentation with different conservation systems.

Forage quality refers to how animals consume feed and how efficiently these feeds are converted into animal products. The factors that provide farmers with sound information on forage quality can be grouped as follows: organoleptic parameters, parameters that enable producers to assess forage chemical composition, processing and conservation, digestion and energy content. The main parameters used to assess forage quality are: crude protein, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, dry matter, pH, amoniacal nitrogen, acid detergent insoluble nitrogen and neutral detergent insoluble nitrogen.

Both beneficial and spoilage microorganisms present in forages have a direct impact on feed conservation processes.

Beneficial flora, maily made up of acid lactic bacteria, exerts a major influence in maintaining an appropriate pH level by limiting the development of non-beneficial microbial flora (*Clostridium*, *E.coli*, other gram-negative bacilli, yeast-like and/or filamentous fungi). Some fungal genera such as *Aspergillus*, *Fusarium*, etc., which contaminate both raw materials and feeds for animal consumption, have become particularly relevant due to their pathogenic and/or toxigenic capacity.

Thanks to the study on the chemico-fermentative quality of feeds (maize, sorghum and lucerne forages) for animal consumption in the dairy regions within the province of Santa Fe, it was possible to classify sorghum and maize samples as mostly fair; while lucerne samples were classified as fair or bad. In addition, the use of the bunker system was considered not to be recommended for storing sorghum forages.

According to the total fungi count, maize silages presented the highest contamination levels followed by lucerne silages. Yeast-like fungi had the highest prevalence rate in every forage. Among the filamentous fungi, those that were potentially toxigenic were the most isolated ones. The genus *Aspergillus* was the most prevalent in all of the three substrates; those belonging to *Aspergillus* section *Flavi* were the most frequently found. When the toxigenic levels of isolates were evaluated *in vitro*, it was confirmed that two *Aspergillus* strains showed aflatoxin-producing capacity while two strains belonging to the genus *Fusarium* showed capacity to produce fumonisins.

The highest incidence of aflatoxins (AF) and deoxynivalenol (DON) was found in lucerne and maize silages with levels that were not fit for animal consumption; both toxins were mainly detected together. The highest DON values were found in maize and lucerne forages; while the highest AF concentrations were found in sorghum silages.

According to the overall assessment of each and every studied variable, it could be concluded that in many cases, chemico-fermentative or toxic-mycological parameters *per se* were not comprehensive enough to evaluate forages. An analysis protocol was designed including indication variables to ensure a simple and reliable assessment of forage final acceptability.

Taking into account the analysis of the chemico-fermentative and toxic-mycological parameters or their indication variables, most lucerne and maize samples were not fit for beef cattle consumption, while almost half of the sorghum forages were also considered risky.

Steps to prevent quality deterioration should be included in every feed conservation program. Biological control is proposed as a tool that would enable producers to control the density of pathogenic microorganisms and/or their effects; it is a more innocuous alternative to chemical control. One strain of

*Streptomyces* sp., C/33-6, and one of *Lactobacillus buchneri*, LAB/7, were respectively selected as potential biocontrol agents for toxigenic fungi.

Experimental silos, which were designed following actual field conditions, were used for the inoculation of the microorganisms previously chosen as potential biocontrol agents and a toxigenic strain of *A. parasiticus*, 5M43.

Due to these experimental conditions, the resulting chemico-fermentative quality of silos was not very good. Under good conservation conditions, experimental micro-silos (EMSs) presented fair quality levels. Unfavourable conditions affected the chemico-fermentative quality of silos, so that it was classified as Bad. Whereas, those silos that had been inoculated with LAB/7 were classified as Fair. Every EMS classified as Fair was acceptable in its final assessment.

Based on the joint analysis of each and every parameter, the final acceptability of EMSs agreed with the outcome data provided by the indication variables.

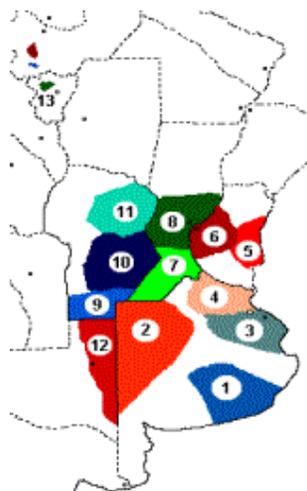
Under these conditions, *Lactobacillus buchneri* LAB/7, turned out to be more promising than *Streptomyces* sp. C/33-6, as a biocontrol agent.

*Introducción*

## EL GANADO Y SU ALIMENTACIÓN

La República Argentina es un país que se ha caracterizado a lo largo del tiempo por su importante producción agropecuaria. Sus sistemas de producción ganadera están basados en el pastoreo. Las características de su territorio, de grandes y fértiles extensiones han influido y potenciado el desarrollo de la actividad agrícola-ganadera, uno de los más importantes pilares sobre el que se asienta la economía argentina.

La producción láctea de Argentina se concentra en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y Tucumán (Fig 1) (Ordoqui y col., 2005).



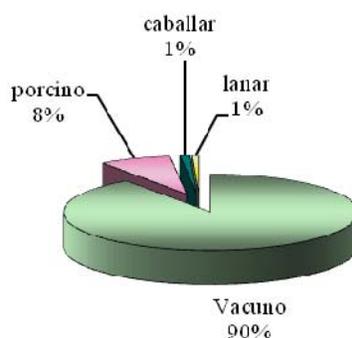
**Fig 1:** Cuenca láctea de Argentina: Buenos Aires (1. Mar y Sierras, 2. Oeste, 3. Abasto Sur, 4. Abasto Norte), Entre Ríos (5. Cuenca “B”, 6. Cuenca “A”), Santa Fe (7. Sur, 8. Central), Córdoba (9. Sur, 10. Villa María, 11. Noreste), La Pampa (12. La Pampa) y Tucumán (13. Cuenca de Trancas).

La provincia de Santa Fe integra la región agrícola-ganadera e industrial de la Argentina donde se concentra la mayor parte de la población del país. Se encuentra ubicada entre los meridianos de 59 y 63 grados de longitud oeste y los paralelos de 28 y 34 grados de latitud sur y se caracteriza por poseer una extensa planicie de suelos fértiles aptos para todo tipo de actividad agrícola-ganadera. [javascript:;](#) Por sus índices de producción y por su aporte al producto global de la Argentina, constituye una de las más importantes provincias del país. La adecuada distribución geográfica de las actividades, así como su diversidad, son claros indicadores del equilibrio de

su economía. El importante sector industrial junto al de la construcción aportan casi el 36% del producto bruto interno provincial, una fuerte base agrícola-ganadera contribuye con el 18% y el sector terciario o de servicios con el 53% restante.

La cuenca lechera santafesina constituye la región productora más importante de América Latina y el área de asentamiento de las principales industrias procesadoras de lácteos. El ganado vacuno representó el 90% del total de las cabezas censadas durante el 2006 según datos aportados por la encuesta ganadera 2007 (Fig 2). La producción anual en 2006 fue de 1800 millones de litros de leche aproximadamente (IPEC.2006).

■ vacuno ■ porcino ■ caballar ■ lanar



**Fig 2:** Distribución del ganado por especie en la provincia de Santa Fe.

Los sistemas de producción de carne y lácteos demandan un conocimiento profundo de todos sus procesos y de la calidad de los alimentos (Bruno y col., 1998). A pesar de que pueden variar según la región, los sistemas de producción de ganado se basan en el pastoreo directo de los recursos forrajeros suplementado con granos, subproductos de las cosechas, forrajes almacenados como heno o ensilaje, etc. Estos métodos tratan de optimizar la gestión de la alimentación ganadera para lograr una mejora en la relación costo-beneficio (Taysom, 2002; Beltzer, 2003; Colombatto y col., 2000).

La conservación de los alimentos para su consumo en períodos de escasez ha sido una preocupación del hombre desde épocas remotas. Existen evidencias

arqueológicas de estas prácticas que datan del 2000 AC (Rees, 1997; Woolford y col., 1980).

La preservación de forrajes surgió, también de la necesidad de almacenar los excedentes de alimentos tales como alfalfa, trébol, maíz, sorgo, avena, pastos, soja, etc. (Romero y col., 2003). Sin embargo en la actualidad estas reservas de alimentos se usan durante todo el año, para obtener raciones diarias mejor balanceadas formando parte de un sistema de alimentos más eficiente. La metodología empleada evoluciona constantemente para lograr el mejor producto final (Fulgueira y col.; 2007).

La exposición de los cultivares forrajeros al medio ambiente provoca un aumento en la actividad aeróbica microbiana causando una pérdida del valor nutritivo de los alimentos y eventualmente una contaminación con metabolitos y/o productos tóxicos producidos por la flora indígena. La exclusión total de O<sub>2</sub> facilita la proliferación de la flora anaerobia obteniéndose alimentos conservados con alto contenido de etanol y de diferentes ácidos orgánicos como ácido láctico y ácido butírico. La preservación de los alimentos por fermentación en silos favorece la proliferación de bacterias ácido lácticas (BAL) con las que se logra un pH adecuado, aproximadamente 4, para regular o inhibir la proliferación de microorganismos indeseables o potencialmente perjudiciales como por ejemplo *Clostridium* spp., *Listeria* spp. y Enterobacterias (Scudamore y Livesey, 1998; Fulgueira y col.; 2007).

Elaborar reservas de alimentos lleva implícito conocer los sistemas de conservación a utilizar.

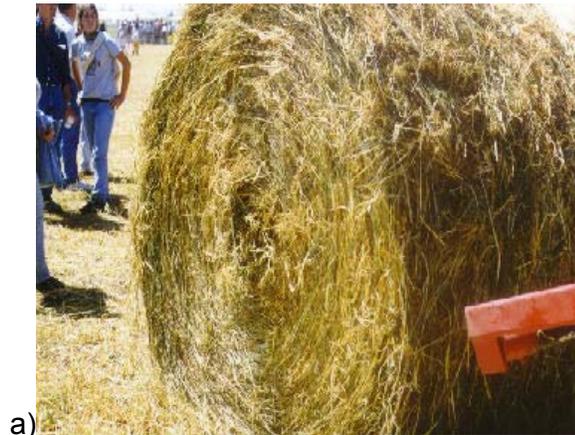
## **SISTEMAS DE CONSERVACIÓN**

### **Conservación por deshidratación**

#### *Heno*

La henificación es un método de conservación de forraje seco donde se produce la evaporación del agua contenida en los tejidos de la planta. Se comienza el enfardado/arrollado con 25% de humedad (Fig 3) para llegar al 15% durante el almacenaje (Beltzer, 2003; Reboux y col., 2006). Aunque la mayoría de los cultivos forrajeros se pueden almacenar como heno, su valor nutricional está estrechamente

relacionado al tipo de planta almacenada. Entre los importantes beneficios de la conservación del forraje por este sistema se pueden mencionar los bajos requerimientos de trabajo agrícola y la reducción de los costos de producción (Lascano, 2002; Romero y col., 2003).



a)



b)



c)

**Fig 3:** Heno. a) Fabricación de rollos para conservación de pasturas con bajo contenido de humedad. b) y c) Almacenamiento a campo de rollos y fardos.

## Conservación por fermentación

### *Ensilados*

El forraje que se desea conservar por vía húmeda es cosechado por máquinas especialmente diseñadas para este propósito, las que cortan y pican el alimento que luego se transporta y acumula sobre el terreno o construcciones especiales.

En esta masa verde acumulada comienzan muy pronto a producirse una serie de transformaciones bioquímicas que al cabo de cuatro o cinco semanas concluyen dando como resultado un producto que se conoce con el nombre de silaje. Los cultivos forrajeros frescos, como el maíz, sorgo, trigo y alfalfa, pueden ser preservados como ensilados (Oude Elferink y col., 1999a). Este método de conservación de alimentos, basado en la fermentación con producción espontánea de ácido láctico bajo condiciones anaeróbicas, tiene por objeto minimizar la pérdida de nutrientes a partir de la cosecha durante el almacenamiento y mejorar la calidad de los piensos (Whitlow y Hagler, 2002; Beltzer, 2003; Seglar, 2004).

Las BAL pertenecientes a la flora epífita de los vegetales que serán usados como alimentos conservados, están involucradas en la fermentación de los carbohidratos solubles en agua produciendo ácido láctico y, en menor medida, ácido acético. Como se mencionó anteriormente, este proceso metabólico provoca descenso del pH del material ensilado y la restricción de la actividad microbiana evitando el proceso de descomposición. Una vez que el material fresco se ha almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, el proceso de ensilado puede dividirse en cuatro fases (Oude Elferink y col.; 1999a):

*Fase aeróbica:* En esta fase, que sólo dura unas pocas horas, la cantidad de O<sub>2</sub> atmosférico presente en el forraje se reduce debido a la respiración de las plantas y de los microorganismos aerobios facultativos tales como levaduras y enterobacterias.

*Fase de fermentación:* Se inicia una vez que las condiciones anaeróbicas se alcanzan en el material ensilado. Su duración puede ser de varios días o de varias semanas, dependiendo del material ensilado. Si la fermentación se lleva a cabo con éxito, las BAL desarrollarán y se convertirán en la población predominante, mientras que el pH disminuirá a valores cercanos a 4,0.

*Fase estable:* Dura mientras el alimento almacenado se encuentre debidamente sellado de manera que el aire no pueda penetrar. La población microbiana de la etapa anterior disminuye lentamente.

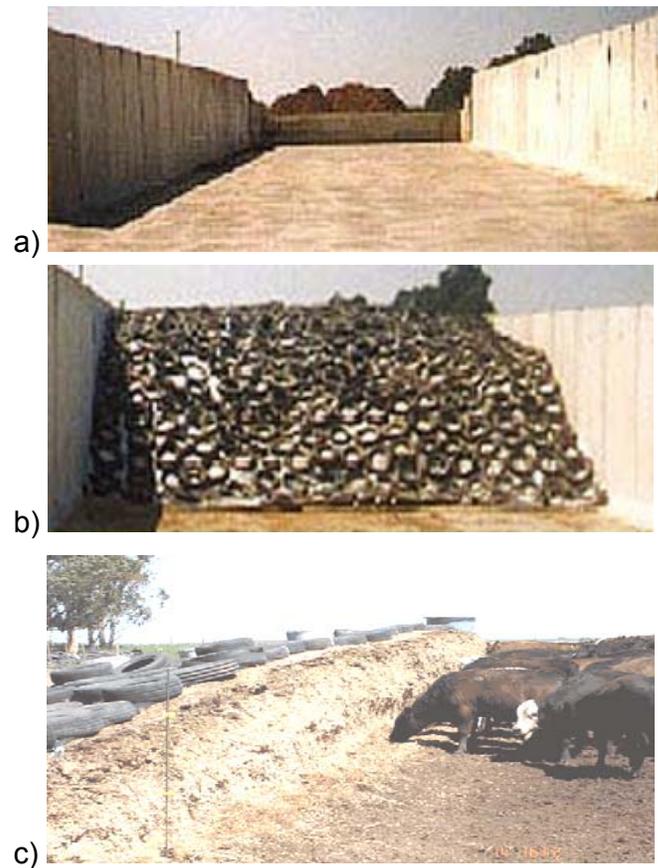
*Fase de descomposición aeróbica:* Comienza cuando el silo es abierto y el O<sub>2</sub> tiene acceso sin restricciones al ensilaje o cuando la cubierta es dañada por animales u otros agentes. La disponibilidad de O<sub>2</sub> permite la proliferación de levaduras, hongos y bacterias aerobias facultativas provocando un aumento del pH y de la temperatura que deterioran la calidad del alimento (Driehuis y col., 1999; Driehuis y Oude Elferink, 2000).

El uso de ensilados presenta las siguientes ventajas (Cowan, 2001; Schroeder, 2004a; Romero y col., 2006):

- Disponer de pastos o cultivos en condiciones óptimas de nutrición y almacenamiento, como reserva para períodos de extrema escasez de alimentos.
- Evitar las pérdidas debidas a la maduración o a la vejez *in situ* producidas por el desarrollo de la planta forrajera.
- Permitir balancear la composición de la ración frente a pastoreos deficitarios en algunos nutrientes. Por ejemplo, el uso de ensilaje de leguminosas como complemento de ensilaje de maíz, o combinar el uso de ensilaje de maíz o de leguminosas con pastos, o recurrir a ensilajes de variado contenido de fibra (Schroeder, 2004b).
- Preservar el contenido de materia seca y mantener las características del alimento como sabor, consistencia y composición.
- Minimizar las diferencias de calidad nutricional con el forraje verde cuando se ha realizado un proceso de conservación adecuado.
- Independizar al producto de los factores climáticos.
- Permitir, mediante el encierre de la hacienda, esperar que haya piso para el establecimiento de praderas o verdes adecuados.
- Conservar aquellos forrajes que serían difíciles de henificar, tales como el maíz o el sorgo.
- Disminuir los riesgos de incendio.
- Reducir costos. Luego de las pasturas es el forraje que presenta menores costos, muy por debajo de los granos.

- Mejorar la productividad debido al aumento de la cantidad de alimento disponible para el ganado.

Los forrajes pueden ser ensilados en diferentes modalidades: silo puente o bunker (Fig 4 a, b y c), silo bolsa (Fig 5), etc.



**Fig 4:** Silo puente. a) Estructura del silo previo al llenado. b) Silo lleno y cubierto con plástico protector. c) Apertura del silo puente para la alimentación del ganado.



**Fig 5:** Silo bolsa. Banda lateral en posición correcta de llenado de la bolsa (indicada por la flecha).

### Henolajes

Es un sistema de conservación para forrajes con alto contenido de humedad. El alimento es conservado en un proceso combinado de henificación y de silaje. Cuando el forraje alcanza un 50 % del contenido de humedad es enrollado y luego empaquetado en bolsas de polietileno o auto-ajustables (Fig 6 y Fig 7). De este modo, la falta de O<sub>2</sub> genera un ambiente propicio para el inicio de la fermentación anaeróbica (Lascano, 2002).



**Fig 6:** Henolaje. Rollos de forraje húmedo cubiertos con plástico tricapa.



**Fig 7:** Acopio a campo de alimentos conservados por henolaje.

Aunque cualquier forraje puede ser henificado es aconsejable usar pastos de alta calidad como alfalfa, trébol o hierbas con un alto valor alimenticio ya que el

costo adicional asociado con el embalaje deberá ser justificado (Beltzer, 2003). Las ventajas más significativas de este sistema están relacionadas con aspectos agronómicos y alimenticios como por ejemplo (Schroeder, 2004c; Muck y Holmes, 2006):

- Reducir las pérdidas producidas por factores climáticos al acortar los períodos de oreado (secado).
- Minimizar todas las pérdidas relacionadas con el material (principalmente de hojas y con los procesos de enfardado (uso de forraje mojado), distribución y suministro.
- Utilizar pequeñas parcelas para su almacenamiento.
- Iniciar el proceso de fermentación anaerobia casi en forma inmediata.
- Invertir poco capital para su confección y almacenamiento.
- Facilitar la administración de las raciones.
- Disminuir las pérdidas por almacenamiento, las que se estiman entre el 3-7%.

### **Embolsado del forraje**

Las bolsas de ensilado para conservación de forrajes y almacenamiento de granos consisten en un tubo de polietileno plegado, fabricado bajo el sistema de coextrucción en tres capas (tricapa), en dos colores blanco y negro (bicolor) que cuenta con estabilización ultravioleta. Se fabrican con materia prima virgen de última generación otorgándole excelentes propiedades de resistencia mecánica, elasticidad al “punzonado”, opacidad, impermeabilización a los gases, creando un ambiente libre de O<sub>2</sub> y una alta concentración de CO<sub>2</sub> indispensable para asegurar la conservación del forraje (Martinez y col., 2002).

## **CALIDAD DE LOS FORRAJES**

### **¿Que es la calidad?**

La calidad de un forraje se define como expresión de las características que alteran el consumo, el valor alimenticio del producto afectando la performance del animal (Amigot y col., 2006; Fulgueira y col., 2007). Es decir la calidad del forraje se

refiere a cómo los animales consumen un alimento y a cómo los alimentos se convierten eficientemente en productos animales (Twidwell y Wegenhoft, 1999; Taysom, 2002). Así, la mejor medida relacionada con la calidad del forraje es el valor nutricional y consecuentemente la productividad animal.

Existen seis factores biológicos y tecnológicos tradicionalmente reconocidos que afectan la calidad del forraje: especie de cultivar, variedad del cultivar (híbrido), fertilidad del suelo, grado de madurez, condiciones de cosecha y almacenamiento y factores ambientales (Frey y col, 2004; Schroeder, 2004c; Reboux y col., 2006).

*Especie de cultivar.* Puede haber diferencias substanciales en la calidad del forraje entre las hierbas y las leguminosas. Estas distinciones se relacionan generalmente con las diferencias en el contenido de fibras y compuestos proteicos, en la digestibilidad, etc. (Twidwell y Wegenhoft, 1999; Cherney, 2000). Otro factor importante a tener en cuenta es el contenido de azúcares solubles característico de cada especie. Es de suma importancia que la relación azúcar/proteína esté en valores altos para evitar excesos de  $N_2$  producidos por la degradación proteica con formación de productos tóxicos o productos que neutralicen el ácido láctico formado durante la fermentación. Esto sucede en las leguminosas como la alfalfa donde esta relación es baja y la conservación por esta técnica es dificultosa. La Tabla 1 establece la aptitud para ensilados en base al contenido de azúcar soluble y al contenido proteico de la especie cultivada (Bertoia, 2007).

**Tabla 1:** Evaluación de la aptitud del ensilado en relación al contenido de compuestos proteicos y de azúcares con la matriz.

Tipo cultivo	Azúcares solubles	Compuestos proteicos	Aptitud para ensilado
Maíz o Sorgo	Muy alto	Muy bajo	Alta
Pasturas gramíneas	Alto	Medio	Media
Alfalfa	Bajo	Muy alto	Problemática

*Variiedad de cultivar.* Un buen híbrido es el que aporta mayor proporción de espigas con alta proporción de granos y por lo tanto una mayor digestibilidad. La calidad de un cultivo no se puede mejorar con el proceso de ensilado, por el contrario, se puede empeorar, por lo que es de fundamental importancia partir de un buen híbrido.

*Fertilidad del suelo:* La fertilidad del suelo influye en la calidad del forraje. Los niveles apropiados de P y de K del suelo no solamente contribuyen al desarrollo de las leguminosas sino a reducir el problema de las malezas. Es necesario balancear la fertilidad del suelo para evitar desequilibrios minerales. Se ha probado que altos niveles de fertilización se traducen en un aumento de la materia seca. Sin embargo, los valores de nitrógeno no proteico también aumentan, provocando un desequilibrio en la relación carbohidrato/proteína. Por lo tanto, el proceso de fermentación puede ser afectado (Schroeder, 2004d).

*Grado de madurez.* Se debe tener en cuenta el estado de desarrollo de la planta en el momento de la cosecha. Las plantas declinan en su calidad cuando se alcanza la madurez y la cosecha se retrasa aún en 2 o 3 días. Si bien los componentes de la pared celular como proteínas, carbohidratos solubles, vitaminas, etc., aumentan con el paso del tiempo, también lo hacen componentes como lignina y hemicelulosa. La hemicelulosa es parcialmente digerida, en cambio la lignina no lo es, provocando una disminución en la digestibilidad y en el consumo del alimento (Twidwell y Wegenhoft, 1999).

*Condiciones de cosecha y almacenamiento:* Técnicas inapropiadas de cosecha pueden perjudicar seriamente la calidad del ensilado. El almacenado con contenido de humedad inapropiado favorece el desarrollo de microorganismos no deseados como los hongos. Este tipo de contaminantes, durante su respiración, aumentan la temperatura provocando mermas en la digestibilidad y en el contenido proteico del silo.

*Factores ambientales:* Temperatura, humedad y luz solar afectan el proceso de confección y la calidad del silo. Factores climáticos como lluvias, temperaturas altas o sequías excesivas pueden retrasar la cosecha alterando la calidad del producto almacenado por presentar mayor proporción de lignina. Además, las malezas, el daño ocasionado por insectos, o la presencia de bacterias, mohos y/o sus

metabolitos (micotoxinas) afectan de manera significativa la calidad del forraje (Cherney, 2000).

Los desequilibrios producidos por estos factores, se traducen en pérdidas de productividad en los sistemas ganaderos (Gallardo, 2007).

Otros factores para tener en cuenta son *compactado, llenado, tapado, extracción y suministro* del silo que dependerán del sistema de conservación. El llenado de los silos bunker o puente se debe realizar en capas de 10cm compactando entre cada una de ellas. El indicador de una buena compactación en este sistema es la estabilidad de la temperatura en la masa ensilada. En los silos bolsa la compactación se realiza durante el llenado y el indicador de una buena compactación es la correcta posición de la banda lateral de la bolsa (Fig 5)

El tapado del silo se debe realizar inmediatamente después que se retiran las máquinas ensiladoras, evitando las roturas del plástico cobertor. La extracción y el suministro pueden alterar la calidad del alimento (Bolsen, 1998; Jahn y col., 2000).

### **Evaluación de la calidad**

Conocer la calidad del ensilado permite saber que tipo de suplemento dietario necesitará el animal.

Los parámetros que brindan al productor información sobre la calidad de un forraje pueden agruparse en cinco grandes grupos: organolépticos, parámetros que permiten evaluar la composición química, el procesamiento y conservación, la digestión y el contenido de energía del mismo.

#### *Parámetros que permiten evaluar las características organolépticas:*

*Color:* Los silos pueden presentar una gama de colores de verde a marrón. El color es un buen indicador de las condiciones de almacenamiento, humedad y sobrecalentamiento del silo. Un silo con tonalidades verdes es asumido como de buena calidad, en cambio uno marrón, por generación de lignina artificial, indica un sobrecalentamiento. La presencia de zonas blancas es indicadora de desarrollo fúngico.

*Olor:* Puede variar del tenue olor a vinagre (óptimo) a fuerte olor rancio y pútrido característico de fermentación butírica o a alcohol por fermentación

alcohólica. El olor a tabaco que puede presentar el heno es índice de sobrecalentamiento.

*Textura:* Está directamente relacionada con la flexibilidad y el tamaño de tallos y hojas y con el aspecto del grano. También aporta datos acerca de la humedad del material en el momento del ensilado.

La Tabla 2 resume la relación entre las características sensoriales y fermentativas con el tipo de ensilado.

#### *Parámetros que permiten evaluar la composición química*

*Proteína bruta (%PB):* Incluye las fracciones nitrogenadas proteicas y no proteicas (nitratos, péptidos, aminos y aminoácidos). Un valor alto de PB no representa necesariamente un óptimo nivel proteico.

*Fibra detergente neutra (%FDN):* Es una medida del contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina entre otros componentes de la pared celular vegetal. La relación no es directa ya que el %FDN depende también de la composición química y del tamaño de las partículas: cuanto más pequeñas, menos fibra efectiva (FDNef).

*Fibra detergente ácida (%FDA):* Mide la cantidad de celulosa ligada a la lignina. Está inversamente relacionada a la digestibilidad del forraje.

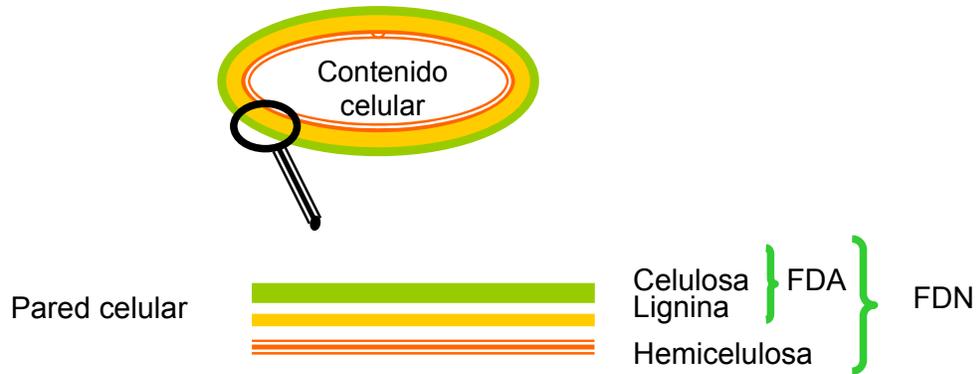
*Lignina:* Da sostén y rigidez a la planta. Depende de la madurez de la planta y del tipo de matriz (por ejemplo la alfalfa presenta alto contenido de lignina). Altos contenidos de lignina dificultan la fermentación ruminal.

*Cenizas (%CZ):* Es la fracción mineral del forraje. Se aceptan %CZ inferiores al 10%, valores mayores se asocian a contaminación con tierra. Se recomienda el análisis de Ca, P, K, Mg, elementos fundamentales para lograr un balance óptimo de la dieta.

**Tabla 2.** Características sensoriales y fermentativas que permiten evaluar el tipo de ensilajes

Tipo de ensilado	Características	
	Sensoriales	Fermentativas
<b>Correcto</b>	Color verde amarillento, olor agradable, leve avinagrado. Textura firme. Aceptación por el animal.	pH 4 a 5, predomina fermentación láctica. Digestibilidad alta
<b>Butírico</b>	Color verde parduzco. Olor desagradable, rancio y persistente. Textura delicada.	Fermentación butírica, por excesiva humedad.
<b>Podrido</b>	Verde oscuro, casi negro. Muy húmedo. Olor desagradable. La hacienda lo rechaza.	Fermentación pútrida pH > 5, que permite la proliferación de bacterias anaerobias tales como <i>Clostridium</i> .
<b>Recalentado</b>	Color marrón. Atabacado.. Menor palatabilidad.	Aire en la confección y estacionamiento. Menor digestibilidad
<b>Quemado</b>	Marrón oscuro. Olor a caramelo y/o a tabaco. Muy seco.	Mucho aire en la confección y estacionamiento.
<b>Mohoso</b>	Manchones blancos, oscuros o marrones. Baja palatabilidad. La hacienda lo rechaza.	pH > 5,5
<b>Desechable</b>	Color negro, en general en la parte superior, extremos y a los costados del silo.	Mayor humedad y entrada de aire. Contaminación por <i>Clostridium</i> .

La Fig 8 sintetiza la composición de la pared celular vegetal y su relación con los parámetros que permiten evaluarla.



**Fig 8:** Composición de la pared celular vegetal

*Parámetros que permiten evaluar procesamiento y conservación del alimento*

*Materia seca (%MS):* Es una medida de la cantidad de agua que contiene el forraje (Fig 9). Para ensilar un cultivo deben tenerse en cuenta ciertas consideraciones tales como que presente un alto rinde de %MS y alto valor nutritivo (Gallardo, 2007).

<b>ALIMENTO</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	
	<b>MATERIA SECA</b>	<b>COMPONENTES INORGÁNICOS</b>
		<b>COMPONENTES ORGÁNICOS</b>
		<b>CARBOHIDRÁTOS</b> <b>LÍPIDOS</b> <b>PROTEÍNAS</b> <b>ÁCIDOS GRÁSOS</b> <b>ÁCIDOS ORGÁNICOS</b> <b>VITAMINAS</b>

**Fig 9:** Composición de un alimento. Relación materia seca- agua

*pH*: Indica el grado de acidez del material y la calidad de la fermentación. El método para medir el pH es rápido y simple: el electrodo del pHmetro se pone en el líquido obtenido por presión de la muestra o por su maceración. Valores de pH superiores a 5,5 indican fermentación láctica inadecuada o fermentación butírica (Ferret, 2003; Maculay, 2003; Ward, 2005).

*Nitrógeno amoniacal* (%NH<sub>3</sub>/NT): Medido como proporción de Nitrógeno total (NT) del forraje. Indica el grado de degradación proteica. Valores superiores a 15% no son adecuados e indican mala conservación (Driehuis y Oude Elferink, 2000; Ferret, 2003).

El pH y la relación %NH<sub>3</sub>/NT son dos de los parámetros importantes para evaluar la aceptabilidad química de un alimento. La American Society of Agronomy (1994) ha definido a la aceptabilidad química como:

- Muy Buena: pH ≤ 4 y % NH<sub>3</sub>/NT ≤ 5.
- Buena: pH ≤ 4 y % NH<sub>3</sub>/NT entre 5 y 15
- Regular: pH > 4 y % NH<sub>3</sub>/NT ≤ 15
- Mala: pH > 4 y % NH<sub>3</sub>/NT > 15

*Nitrógeno insoluble en detergente ácido y en detergente neutro* (%NIDA/NT y %NIDN/NT respectivamente): Miden indirectamente la proporción del daño de las proteínas y las fibras. Valores superiores a 15% no son adecuados indicando que el forraje ha sufrido calentamiento y se han formado compuestos indigestibles.

*Ácido láctico*: Es un ácido graso volátil producto de la buena fermentación anaerobia de los hidratos de carbono. Su concentración es proporcional a la disponibilidad de almidón o de azúcares solubles en la matriz del forraje.

*Ácido butírico*: Es un ácido graso volátil producto de una mala fermentación de carbohidratos. Valores superiores al 0,1% le confieren al ensilado olor pútrido lo que provoca el rechazo por parte del animal.

..

*Parámetros relacionados con la digestión*

*Digestibilidad in vitro de MS* (%DIV/MS): Brinda una medida del porcentaje de alimento que queda retenido en el proceso de digestión. Si el valor supera el 55%, el forraje se considera de baja calidad.

*Tamaño de partículas:* Se determina por pasaje del forraje por tamices de distintos tamaños de poro debidamente estandarizados. Es un buen indicador del %FDNef.

*Fibra detergente neutra digestible (%FDN digestible):* Calcula la proporción de pared celular que podrá ser digerida en el rumen.

*Parámetros que permiten evaluar el contenido de energía de un ensilado:*

Todas las funciones vitales, reproductivas y productivas (producción de leche, carne, grasas, etc.) de un animal requieren energía, por lo tanto es de gran importancia conocer el valor nutritivo de los alimentos.

Existen diferentes formas de evaluar el aporte energético de un alimento:

*Energía neta (EN):* Es la energía del alimento que queda disponible para el mantenimiento corporal y los distintos procesos productivos. La energía neta se puede clasificar en EN de lactación (ENL) y EN de crecimiento. Existen ecuaciones para estimar la ENL y la EN de crecimiento que brinda un alimento determinado en función de su energía metabolizable o relacionándolos con %FDA y con NDT (nutrientes digeribles totales) cuando el alimento en estudio es un ensilado de maíz.

*Nutrientes digeribles totales (NDT):* Es una medida de la porción digerible del alimento y puede ser usada para estimar el contenido de energía del forraje (Beltzer, 2003). Representa la suma de proteína bruta, carbohidratos y lípidos digeribles. La estimación de este parámetro puede hacerse de diferente manera pero la más utilizada es a partir de ENL (García y col., 2005):

$$\text{NDT} = 31.4 + (53.1 \times \text{ENL})$$

$$\text{ENL} = 1.044 - (0.0124 \times \text{FDA})$$

*Valor relativo de alimento (VRA):* Es un índice que combina la digestibilidad y el potencial consumo del alimento. Es un buen parámetro para comparar forrajes del mismo tipo.

## LA MICROBIOLOGÍA DE LOS FORRAJES

El éxito de los procesos de conservación de alimentos por henificación o ensilado depende en parte de la microflora que se halla presente. Un gran número de microorganismos se presentan como contaminantes naturales en semillas de cereales, oleaginosas y subproductos (Driehuis y col., 1999b). De acuerdo al rol o al tipo de interacción que desarrollan en el ecosistema del alimento los microorganismos pueden ser clasificados como benéficos o perjudiciales para el proceso de preservación (Oude Elferink y col., 1999a).

### ***Flora benéfica***

Las BAL juegan un rol importante durante el proceso de fermentación. Esta población microbiana sufre un importante incremento durante el período comprendido entre la cosecha y la confección del ensilaje. Características inherentes al material como materia seca y carbohidratos solubles, junto a características microbianas como velocidad de desarrollo de las BAL, tolerancia al pH, osmotolerancia, influyen en la competencia con la flora acompañante. La prevalencia de las BAL durante el proceso de fermentación asegura un valor óptimo de pH limitando el desarrollo de la flora microbiana no benéfica (Mc Donald y col., 1991; Oude Elferink y col., 1999a, Oude Elferink y col., 1999b).

Las BAL son un grupo de bacterias pertenecientes a diferentes géneros taxonómicos pero agrupadas bajo las siguientes características: cocos o bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, no pigmentados, catalasa negativa y que producen principalmente ácido láctico. Son termotolerantes, y si bien pueden desarrollan entre 5 y 50°C, para la mayoría de las especies la temperatura óptima de desarrollo es de 30°C (Mc Donald y col. 1991).

Los componentes del grupo BAL que se asocian al proceso de ensilaje son: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. El género más importante en ensilados es *Lactobacillus*. (Bottazzi, 1988, Axelsson, 1998).

Las BAL pueden ser calificadas en 3 grupos de acuerdo al metabolismo de los azúcares: homofermentadoras, heterofermentadoras facultativas y heterofermentadoras obligadas (Tabla 3).

Las homofermentadoras obligadas o grupo I convierten las hexosas en ácido láctico, pero son incapaces de fermentar pentosas o gluconato. En este grupo se incluyen microorganismos de especial relevancia durante la fermentación del ensilado como *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilacticus* y *Enterococcus faecium*.

El grupo II, heterofermentadores facultativos, producen ácido láctico a partir de la glucosa y pueden degradar pentosas produciendo ácido láctico, etanol y/o ácido acético.

En el grupo III, heterofermentadores obligados, las hexosas son fermentadas a ácido láctico, CO<sub>2</sub> y etanol y/o ácido acético. Las pentosas son degradadas a ácido láctico y ácido acético.

**Tabla 3:** Características de las BAL aisladas de ensilados\*

Género	Fermentación de la glucosa	Morfología	Especies
<b><i>Lactobacillus</i></b>	Homofermentativo Heterofermentativos facultativos	Bacilo	<i>L. ruminis</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. coryniformis</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. pentosus</i> <i>L. salivarius</i>
	Heterofermentativos obligados		<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. viridescens</i>
<b><i>Pediococcus</i></b>	Homofermentativo Heterofermentativos facultativos	Coco	<i>P. acidilacti</i> <i>P. damnosus</i> ( <i>cerevisiae</i> ) <i>P. pentosaceus</i>
<b><i>Enterococcus</i></b>	Homofermentativo Heterofermentativos facultativos	Coco	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
<b><i>Lactococcus</i></b>	Homofermentativo	Coco	<i>L. lactis</i>
<b><i>Streptococcus</i></b>	Homofermentativo	Coco	<i>S. bovis</i>
<b><i>Leuconostoc</i></b>	Heterofermentativo obligado	Coco	<i>L. mesenteroides</i>

\*McDonald y col., 1991.

### **Flora indeseable**

La conservación de alimentos con alto contenido de humedad depende principalmente del control de los microorganismos indeseables como ciertas bacterias y hongos. El rápido descenso del pH y la imposición de las condiciones de anaerobiosis son condiciones para que las BAL proliferen logrando un pH cercano a 4, óptimo para una preservación exitosa. Cuando el pH de un silaje es superior a 5 pueden desarrollar microorganismos indeseables, como *Clostridium*, que fermentan los carbohidratos solubles y ácidos orgánicos produciendo ácido butírico, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (silaje color negro y olor rancio) (Tabla 2). Incluso otras bacterias proteolíticas pueden fermentar los aminoácidos y generar especialmente amonio (olor a NH<sub>3</sub> o a orina) y aminas (olor pútrido). Estas últimas estimulan el rechazo del alimento, por parte de los animales. (Fernandez Meyer, 1999).

### **Contaminación bacteriana de los forrajes**

#### Enterobacterias

Si bien la mayoría de las enterobacterias que pueden estar presentes en un ensilado no son perjudiciales, establecen una competencia con las BAL por los azúcares y degradan las proteínas. Esto provoca una reducción del valor nutritivo del alimento por la merma de las proteínas del ensilado y por la formación de compuestos tóxicos (aminas biógenas) como producto de la degradación proteica. Este proceso degradativo altera la palatabilidad del alimento (Mc Donald y col., 1991; Van Os y Dulphy, 1997). Además el NH<sub>3</sub> producido en este proceso actúa como buffer provocando un aumento del pH y debilitando el efecto inhibitor sobre especies nocivas. Las enterobacterias pueden degradar el NO<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub>, pudiendo luego degradar el NO<sub>2</sub> producido a N<sub>2</sub>O o a NO. Estos gases producidos pueden ser oxidados por el O<sub>2</sub> del aire y dar diferentes óxidos de N<sub>2</sub>, compuestos gaseosos de diferente color y olor, perjudicial para el tejido pulmonar de los operarios que manipulan el ensilado y de los animales que lo consumen (Woolford, 1984; Spoelstra, 1985).

*Escherichia coli* O 157: Son bacilos Gram negativos (BGN) muy relacionados con patologías en el hombre como el Síndrome Urémico Hemolítico. Se encuentran dispersos en la naturaleza, en el ganado, en pájaros y en animales de hábitos

silvestres. *E. coli* O157 puede sobrevivir a pH 4 - 4,6 en condiciones de anaerobiosis parcial y durante el proceso de deterioro aeróbico inicia su proliferación contaminando el alimento (Driehuis y Oude Elferink, 2000).

*Salmonella*: Son BGN fermentadores de glucosa. Se han identificado numerosos reservorios animales o derivados de éstos. *S. thyphimourium* esta universalmente distribuida mientras que *S. enteritidis* se reconoce como un patógeno emergente de carne y huevos. En muchos países se utilizan los deshechos de aves o sus camas como parte de la alimentación para el ganado favoreciendo la diseminación de estos BGN. Los alimentos para animales como subproductos cárnicos o harinas de huesos se encuentran frecuentemente contaminados con diferentes especies del género *Salmonella*. La utilización de pasturas provee una fuente adicional de contagio a partir de las heces de los animales (D'Mello, 2002).

#### Bacilos Gram positivos esporulados

Clostridios: Son Bacilos Gram Positivos (BGP) anaerobios productores de esporas. Son tanto fermentadores de carbohidratos como de proteínas disminuyendo el valor nutricional del ensilado. La capacidad de este género para sobrevivir a pH gástrico hace que si está presente en los ensilados pueda contaminar productos cárnicos y leche.

Las patologías que puede producir este género revisten distinta gravedad desde el disturbio en la fermentación del silo hasta serios problemas en la salud humana y animal por la presencia de especies toxigénicas como *C. botulinum* asociadas a la presencia de cadáveres de aves, roedores, etc. en el ensilado (Oude Elferink y col., 1999a).

Un ensilaje clostridial se caracteriza por pH>5 con contenido bajo de MS y alto de NH<sub>3</sub> y de aminos y altas concentraciones de ácido butírico (>5g/kg de MS). El descenso rápido del pH y la disminución del a<sub>w</sub> (MS alta) son medidas tendientes a evitar los problemas generados por la presencia de miembros del género *Clostridium* en el ensilado (Oude Elferink, 2002).

Tras la ingestión del ensilado contaminado con *Clostridium*, los esporos que resisten el paso por el tracto gastrointestinal de las vacas, se acumulan en las heces. La leche se contamina principalmente en el momento del ordeño y los esporos permanecen en ella, en estado latente, hasta el proceso de elaboración de

quesos, dado que el tratamiento de pasteurización es insuficiente para destruirlos (Demarquilly, 1998; Franciosa y col., 1999). Durante la producción y la maduración de los quesos se produce la germinación de los esporos y la multiplicación de las formas vegetativas, que fermentan el lactato y liberan gas ( $H_2$  y  $CO_2$ ) y ácido butírico (Rosen y col., 1989; Herlin y Christiansson, 1993).

*Bacillus*: Son bacilos aeróbicos facultativos que fermentan un amplio rango de carbohidratos generando compuestos tales como ácidos orgánicos. Los *Bacillus* se asemejan a los clostridios: son bacterias de forma cilíndrica que forman esporas. Sin embargo, se los puede distinguir fácilmente ya que los clostridios son todos anaeróbicos obligados. Algunos *Bacillus* spp. son capaces de producir sustancias fungicidas y se les ha usado para inhibir el proceso de deterioro aeróbico en ensilajes. Con la excepción de estas especies, el desarrollo de *Bacillus* en el ensilaje es en general considerado como indeseable. Esto se debe a que ellos no sólo son menos eficaces como productores de ácido láctico y acético comparado con el grupo BAL, si no que en las etapas finales, incrementan el deterioro aeróbico. Además, la presencia de esporas de *Bacillus* en leche fresca indicaría una contaminación del alimento con heces de vaca que contiene un alto número de esporas.

Para disminuir el desarrollo de *Bacillus* en el ensilaje, se debería mantener baja la temperatura durante el almacenado, minimizar el ingreso de aire y evitar toda contaminación inicial del ensilaje con tierra o estiércol. (Oude Elferink y col., 2001).

Bacilos Gram positivos no esporulados.

*Listeria*: los integrantes de éste género son BGP aerobios o anaerobios, capaces de desarrollar a temperaturas de refrigeración y tolerar pH cercanos a 4 en presencia de  $O_2$ . Son contaminantes habituales de suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, leche y subproductos, desechos de los mataderos, así como del tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos. El ensilaje es la fuente de diseminación de este microorganismo, siendo los animales más susceptibles aquellos que presentan deficiencias inmunológicas como hembras preñadas o neonatos. En el hombre se han descrito casos fatales de listeriosis (CDC, 2006).

## Contaminación fúngica de los forrajes

La contaminación fúngica de cereales, oleaginosas y forrajes representa un riesgo importante para la salud humana y animal. Tanto levaduras como hongos filamentosos pueden contaminar los forrajes.

### Levaduras

Son microorganismos eucariotas, aerobios facultativos y ácido tolerantes. Los géneros más frecuentemente aislados en ensilado son *Candida*, *Picchia*, *Saccharomyces* y *Toluroopsis*. Su presencia en ensilados está considerada indeseable. Bajo condiciones anaeróbicas las levaduras fermentan azúcares produciendo etanol y CO<sub>2</sub>. La producción de etanol no sólo disminuye el azúcar disponible para producir ácido láctico, sino que también produce un mal sabor en la leche. Bajo condiciones aeróbicas, muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La degradación del ácido láctico eleva el valor del pH del ensilaje, lo cual a su vez permite el desarrollo de otros organismos indeseables que se encuentran en estado latente como *Clostridium* (McDonald y col., 1991). La supervivencia de las levaduras durante el almacenaje depende de la calidad de la anaerobiosis y la concentración de ácidos orgánicos. La actividad inicial de las levaduras parece estar incrementada en forrajes que generan niveles bajos de pH (<5), por ejemplo cuando se trata de materiales con un alto contenido de azúcares como papas, cáscaras de naranja o remolacha azucarera, o cuando se emplean aditivos ácidos. Bajo estas condiciones el ensilaje resultante tiene concentraciones altas de etanol y bajas de ácido láctico. Las levaduras son los microorganismos indeseables más frecuentemente aislados de forrajes. La población de levaduras puede alcanzar 10<sup>7</sup>UFC/g durante las primeras semanas del ensilado, sin embargo el almacenamiento más prolongado disminuye gradualmente su presencia. Recuentos superiores a 10<sup>5</sup>UFC de levaduras/g de material ensilado deben considerarse como excesivos (Driehuis y Van Wikselaar 1996; Oude Elferink y col., 1999b).

### Hongos filamentosos:

Son organismos eucariotas, generalmente aeróbicos. La mayoría de los hongos filamentosos son saprofitos y no patógenos de plantas, animales y humanos.

Sin embargo, un número relativamente pequeño de especies fúngicas pueden ser fitopatógenas y/o causar enfermedades en el hombre (por ejemplo, infecciones, alergias, etc.) y producir toxinas que afectan a plantas, animales y humanos. Presentan además gran habilidad para infectar tejidos vegetales vivos así como gran capacidad de invasión, diseminación y deterioro de productos almacenados (Rankin y Grau, 2002; Fulgueira y col., 2007).

Los géneros aislados frecuentemente de forrajes son: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Byssochlamys*, *Monascus*, *Absidia* y *Trichoderma* (Oude Elferink y col., 2002).

La capacidad que presentan muchos hongos filamentosos de desarrollar y vivir a temperaturas bajas o en materiales con baja  $a_w$  o bajo pH les permite adaptarse y desarrollar sobre sustratos como granos, semillas, frutas, raíces o pasturas. La humedad es el parámetro limitante del desarrollo fúngico en el heno, mientras que en los ensilajes es el pH.

La presencia fúngica en el ensilado es fácilmente detectable por la aparición de zonas coloreadas, ubicadas habitualmente en las capas más superficiales y en contacto con  $O_2$ , indicando condiciones deficientes de cierre, sellado o de compactación. Durante la etapa de deterioro aeróbico toda la masa ensilada puede ser invadida por los hongos (Rankin y Grau, 2002). Es por ello que el productor deberá poner especial atención en los siguientes puntos durante el almacenamiento: el contenido de humedad, la compactación, la cobertura y la posible filtración de  $O_2$  que favorecen el desarrollo y diseminación fúngica en el ensilado (Whitlow y Hagler, 2000). Silajes con concentraciones de  $10^4$  a  $10^5$  UFC de hongos/g pueden considerarse como seguros para el consumo animal principalmente de rumiantes (Mahanna, 1997).

Los cultivos durante su desarrollo pueden contaminarse con hongos que se encuentran en el suelo y en restos vegetales. Ellos pueden contaminar a los cultivos durante todas las etapas de desarrollo o durante la cosecha.

Tradicionalmente los hongos toxigénicos han sido clasificados como de campo (patógenos de plantas) o de almacenamiento. Como microorganismos patógenos de plantas o de campo encontramos a *Claviceps*, *Fusarium* y *Alternaria*, mientras que *Aspergillus* y *Penicillium* son considerados hongos de almacenamiento ya que en esta etapa encuentran condiciones óptimas para su proliferación. Cuando los

hongos de campo son aislados durante el almacenamiento indican condiciones deficientes de conservación del alimento ya que para su desarrollo necesitan un  $a_w$  mayor a la apropiada para esa etapa (Scudamore. y Livesey, 1998; Akande y col., 2006; Amigot y col., 2006).

Los problemas que pueden causar los hongos en los mamíferos se resumen en:

- rechazo del alimento por parte de los animales debido a la alteración de las características organolépticas, palatabilidad, etc.
- disminución del índice de transformación en el animal por una deficiencia nutritiva y energética.
- producción de enfermedades: micosis y micotoxicosis

Micosis: La presencia de hongos en el forraje no sólo es problemática por la disminución de su valor nutritivo y su palatabilidad, sino porque es además una fuente de propágulos fúngicos que al ser inhalados o ingeridos pueden causar patologías en el hombre y los animales, conocidas como micosis (di Costanzo y col., 1995; D`Mello, 2002; Alexander y Pffaller, (2006). Estas micosis se presentan como patologías respiratorias o alérgicas por inhalación de elementos fúngicos, distorsión de la fermentación ruminal, alteración de los ciclos reproductivos, patologías renales, disminución de la conversión del alimento, irritación dérmica u ocular por contacto con el hongo, etc. (Scudamore y Livesey, 1998; Gotlieb, 2002).

Entre los hongos patógenos algunos miembros de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, *Alternaria*, *Mucor* son considerados “patógenos fúngicos emergentes”. Estos hongos representan una amenaza común tanto para la producción agrícola como para la salud de personas inmunocompetentes o inmunodeficientes (Naggie y Perfect, 2009).

Las micosis padecidas por los animales difieren según el género fúngico involucrado. *Aspergillus* spp. produce inapetencia, pérdida de peso, disminución de crecimiento, abortos e interrupción de la lactación (cerdas), disminución de puesta (gallinas ponedoras), úlceras de molleja (aves), disturbios intestinales, mortalidad. *Aspergillus fumigatus*, *A.flavus*, *A.nidulans* y *A.niger* ocasionan aspergilosis pulmonar (aves). *Absidia* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. producen mucormicosis intestinal, irritación de mucosas, diarreas, úlceras de molleja (aves). *Mucor* spp. puede causar mucormicosis cutánea, trastornos intestinales en cerdos y conejos.

*Penicillium* spp. produce úlceras de molleja en aves. *Scopulariopsis* spp. causa nefritis en aves. Levaduras tales como *Candida* spp., ocasionan diarrea en cerdos y candidiasis o muguet en aves (producida esencialmente por *C. albicans*). La contaminación de los forrajes con hongos toxigénicos expone a los animales y al hombre al riesgo de padecer micotoxicosis.

**Micotoxicosis:** Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos cuya producción está regulada por un amplio rango de factores genéticos y ambientales (D'Mello, 2002; Amigot, 2006). El conjunto de patologías producidas por la ingesta, inhalación y/o contacto de micotoxinas es conocido como micotoxicosis.

La contaminación de los forrajes con propágulos fúngicos o con micotoxinas está considerada como un proceso aditivo, que da comienzo en el campo y que continúa durante la cosecha, el secado de los granos y el almacenamiento de los productos del agro (Council for Agricultural Science and Technology, 2003).

Las micotoxinas ejercen sus efectos a través de cuatro mecanismos fundamentales: reducción de la ingesta de piensos, reducción de la absorción de los nutrientes y alteración del metabolismo, alteraciones de los sistemas endocrino y exocrino y supresión del sistema inmunológico, provocando fracaso de los planes de vacunación y aumento de la incidencia de enfermedades en el ganado bovino (Joffe, 1986; Pier, 1992; Coulombe, 1993).

Los efectos biológicos de las micotoxinas dependen de la cantidad ingerida, el número de toxinas presentes, la duración de la exposición a estos tóxicos y la sensibilidad del animal (D'Mello, 2002; Yiannikouris y Jouany, 2002a; Yiannikouris y Jouany, 2002b). Las micotoxinas pueden causar problemas agudos que se presentan como graves para la salud animal o crónicos (Denli y Pérez, 2006). Los efectos crónicos son acumulativos a lo largo del tiempo y son más frecuentes que los agudos. A menudo transcurren varios días o semanas hasta que se detectan los síntomas de intoxicación (Bath y Vasanthi, 2003).

Los problemas de salud pueden variar desde disturbios digestivos, pérdida de peso, disminución de la producción de leche, carne y huevos, problemas de fertilidad a daños serios como cáncer en hígado y riñón y abortos (Scudamore y Livesey 1998; Moss, 2002a; Amigot y col., 2006).

La presencia de más de una micotoxina puede modificar sus efectos. La co-ocurrencia de varias micotoxinas, aún en bajas concentraciones (menores a los

límites estipulados en los países con regulación) es de gran importancia (Rankin y Grau, 2002). Debido a la posibilidad de sinergismo, antagonismo y adición, el efecto de las mezclas no pueden ser estimado basándose sólo en el efecto de las toxinas individuales (Yiannikouris y Jouany, 2002a). Las interacciones aditivas y antagonistas son predominantes mientras que las sinérgicas son las menos frecuentes. (Council for Agricultural Science and Technology, 2003). Se ha registrado la co-ocurrencia de micotoxinas de *Aspergillus* (aflatoxinas y/o ocratoxinas) y de *Fusarium* (DON, toxina T-2, zearalenona y/o fumonisinas) (Dairy Business Communications, 2004; Amigot y col., 2006). El sinergismo más frecuente se presenta entre aflatoxinas y toxina T-2.

El diagnóstico de las micotoxicosis en animales es dificultoso. Los síntomas son generalmente inespecíficos y múltiples, situación que se agrava por la co-ocurrencia de varias micotoxinas.

Aunque se conocen más de 100.000 especies fúngicas, la mayoría de los hongos toxigénicos relevantes pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*.

### *Aspergillus*

Es un género compuesto por un amplio y diverso grupo de hongos con distribución universal, con mayor incidencia en las zonas subtropicales y con climas templados a cálidos. Sus especies pueden afectar a plantas, a animales y al hombre (Pitt, 2000; Pitt y col, 2000). *Aspergillus* es uno de los géneros económicamente más importante, por ello su taxonomía está en constante estudio y revisión (Varga y col., 2003; Balajee y col., 2007; Geiser y col., 2007; Perrone y col., 2007). Es considerado un género oportunista ya que necesita que el hombre o los animales presenten algún tipo de inmunocompromiso y/o una alta carga de propágulos para causar enfermedad (Berek y col., 2001; Dagenais y Keller, 2009).

.Entre los factores de patogenicidad de este género se encuentran:

- El pequeño tamaño de sus conidios que permite que sean aspirados y que puedan causar infección en el pulmón y en los senos paranasales.
- Su capacidad de crecer a 37°C, que lo hace idóneo para afectar al hombre o a los animales.

- Su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos.
- La producción de un gran número de metabolitos extracelulares tóxicos para las células de los mamíferos (elastasa, restrictocina, fumigatoxina, gliotoxina, etc.).

Entre las especies que causan alergia o micosis pueden citarse a *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. níger*, *A. terreus*, etc. (De Lucca, 2007).

Aunque el género *Aspergillus* no pueda ser considerado como el fitopatógeno más importante, muchas de sus especies son responsables de diferentes desórdenes en los vegetales y subproductos. Algunas de ellas pueden contaminar productos agrícolas en diversas etapas de producción (incluyendo pre-cosecha, cosecha, procesado o “en góndola”). El deterioro causado por la presencia de estos hongos en el alimento producirá alteraciones en sus propiedades sensoriales y nutricionales tales como alteración de la pigmentación, putrefacción, desarrollo de olor y sabor desagradables. Sin embargo la consecuencia más notable para la salud es la presencia de micotoxinas, metabolitos secundarios que contaminan los alimentos destinados al consumo humano o animal (Kozakiewicz, 1989; Perrone y col., 2007).

Las condiciones óptimas de preservación de alimentos por fermentación, son las mejores para evitar la contaminación de los cultivos con hongos. La baja disponibilidad de O<sub>2</sub> asegura que sólo unas pocas cepas fúngicas puedan ser capaces de sobrevivir o desarrollar. El pH bajo favorece, además, la inactivación de las micotoxinas.

Las micotoxinas más frecuentemente encontradas en forrajes son: aflatoxinas (AF), zearalenona, ocratoxinas (OT), fumonisinas, deoxinivalenol (DON) y toxina T-2 (Tabla 4) (Akande y col. y col., 2006).

**Tabla 4:** Hongos productores de micotoxinas en alimentos.

<b><i>Aspergillus parasiticus</i></b>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub>
<b><i>Aspergillus flavus</i></b>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub>
<b><i>Fusarium sporotrichioides</i></b>	Toxinas T-2 y H T-2
<b><i>Fusarium graminearum</i></b>	DON o Nivalenol Zearalenona
<b><i>Fusarium proliferatum</i></b>	Fumonisinias B <sub>1</sub>
<b><i>Fusarium culmorum</i></b> <b><i>Fusarium equiseti</i></b> <b><i>Fusarium crookwellense</i></b>	Zearalenona Toxina T-2
<b><i>Fusarium verticillioides</i></b>	Fumonisinina B <sub>1</sub>
<b><i>Penicillium verrucosum</i></b>	Ocratoxina A
<b><i>Aspergillus ochraceus</i></b> <b><i>Aspergillus japonicus</i></b> <b><i>Aspergillus carbonarius</i></b>	Ocratoxina A

Las AF han sido relacionadas con tres grupos filogenéticamente diferentes: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, y *A. pseudotamarii* de la sección *Flavi*, *A. ochraceoroseus* y *A. rambellii* de la sección *Ochraceorosei* y *Emericella astellata* y *E. venezuelensis* en sección *Nidulantes* (Frisvad y col., 2005; Frisvad y col., 2007a). Sin embargo *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* son los productores más frecuentes (Frisvad y col., 2007b).

Se las encuentra principalmente en alimentos como maní, pistacho, nueces, semillas de algodón y maíz (D'Mello, 2002). La Organización Panamericana de la Salud (OPS) las describe químicamente como metabolitos del grupo di furano cumarinas denominados B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (OPS, 1983). Las cuatro sustancias

principales se distinguen por sus colores fluorescentes, B correspondiente al color azul y G correspondiente al verde, con subíndices que indican la movilidad cromatográfica relativa. Otras aflatoxinas conocidas resultan del metabolismo de alguna de éstas, siendo la aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) una de las más relevantes para la salud humana ya que es excretada dentro de las 24hs de su ingestión en la leche y la orina de mamíferos que consumen AFB<sub>1</sub> en la dieta. AFM<sub>1</sub> es menos tóxica que AFB<sub>1</sub>. Los niveles de AFM<sub>1</sub> que aparecen en la leche corresponden generalmente al 1-2% del contenido total de AFB<sub>1</sub> del alimento. Las AF son termotolerantes resistiendo el proceso de calentamiento como por ejemplo la pasteurización por lo que ingresan a la cadena alimentaria (Díaz y col., 1995; Moss, 2002b).

Las aflatoxinas son metabolizadas en el hígado dando origen a un gran número de compuestos que presentan diferentes grados de activación y de toxicidad. El 8,9 epóxido de aflatoxina es el compuesto más tóxico y responsable de la carcinogenicidad de la sustancia (Moss, 2002b).

Las OT son metabolitos producidos principalmente por *Aspergillus* y *Penicillium*. Hasta hace poco se creía que la contaminación de productos de alimentación con OT era causado sólo por *Aspergillus ochraceus* y por *Penicillium verrucosum*, en diferentes regiones del mundo. Actualmente se reconocen más de 20 especies del género *Aspergillus* como productoras de OT *in vitro* (Abarca y col., 1997; Abarca y col., 2004; Frisvad y col., 2004; Samson y col., 2004). Samson (2000) adicionaron a la lista de hongos productores de OT a *A. carbonarius* y *A. japonicus* y a otras especies del *A. niger* complex. Sin embargo, pocas de ellas son productoras de OT en alimentos (Frisvad y col., 2007a).

Las OT se pueden encontrar principalmente en cereales, tales como maíz, cebada, trigo y avena, aunque también han sido detectadas en uvas, granos de café y en café soluble (Díaz, 2005).

La mayoría de las especies animales estudiadas presentan una primera y rápida absorción de OT en el estómago facilitada por sus propiedades ácidas, seguida de una absorción intestinal lenta. La ocratoxina A (OTA) es metabolizada en hígado, sus metabolitos se unen a proteínas plasmáticas y la excreción se realiza principalmente por riñón (Breitholtz-Emanuelsson, 1993). En el caso de los rumiantes la OTA es rápidamente hidrolizada por la flora microbiana ruminal. No obstante se ha detectado OTA en riñón, leche y orina de terneras que habían

recibido grandes dosis de esta toxinas. Se la asocia con efectos inmunotóxicos y carcinógenos, deterioro de la función renal y enzimática., inhibición de la respiración celular y del metabolismo de la glucosa (Whitlow, 1993; Yiannikouris y Jouany, 2002a).

*A.fumigatus* es un hongo termófilo que afecta principalmente las vías aéreas superiores. De distribución cosmopolita, es un oportunista que forma parte de la micota ambiental. Los animales están expuestos a diferentes materiales que pueden vehiculizar sus propágulos: el polvillo producido por su cama, los alimentos, los suplementos y aditivos alimenticios en polvo y el pasto enfardado (De Lucca, 2007). Es un hongo productor de toxinas como la gliotoxina con propiedades inmunosupresoras sobre los leucocitos del hospedero que inhibe la fagocitosis y la transcripción de mediadores del proceso inflamatorio e induce la apoptosis de neutrófilos y monocitos. La cepas de *A. fumigatus* que no producen gliotoxina son menos virulentas que las productoras de esta toxina (Hohl, T. y Feldmesser, 2008).

Otra patología asociada a *A. fumigatus* es el síndrome intestinal hemorrágico (SIH). Este es caracterizado por una ocasional, repentina y progresiva hemorragia masiva en el intestino con la formación subsiguiente de coágulos que generan una obstrucción. Forsberg y Wang (2006) se refirieron a esta patología como una enfermedad multi-factorial que se presenta en animales con un sistema inmune debilitado.

### *Fusarium*

Es un complejo género fúngico de distribución universal. Las especies que lo componen pueden aislarse de diferentes nichos ecológicos. Muchas de ellas son fitopatógenas. Estos hongos son habitantes del suelo y pueden ser recuperados de todos los residuos vegetales desde las raíces profundas hasta las flores. Se encuentran formando parte de la micoflora de productos básicos, como el arroz, porotos, soja y otros cultivos. Si bien la mayoría de las especies son más comunes en áreas templadas, algunos habitan en suelos de climas fríos (Moss, 2002b).

*Fusarium* es un género actualmente señalado como agente causal de infecciones superficiales y sistémicas en los seres humanos (Maggie y Perfect, 2009). La especie más virulenta, en relación a las micosis es *F. solani* (Mayayo y col., 1999). En las infecciones cutáneas la principal vía de penetración de este

microorganismo es la traumática. *Fusarium* es considerado un hongo oportunista ya que sus infecciones se desarrollan en hospederos inmunocomprometidos, principalmente en pacientes neutropénicos y en trasplantados. Las infecciones causadas por *Fusarium*, a posteriori de un trasplante de órgano sólido, tienden a permanecer localizadas y tener una mejor evolución en comparación con aquellas que se presentan en pacientes con neoplasias hematológicas o con trasplantes de médula ósea (Vartivarian y col, 1993).

*Fusarium* es también un género fitopatógeno frecuentemente productor de metabolitos tóxicos que juegan un papel importante en el desarrollo de las enfermedades. Las principales especies toxigénicas de *Fusarium* son: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichoides*, *F. poae*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Las micotoxinas de *Fusarium* que contaminan con más frecuencia los forrajes son: zearalenona, fumonisinas, toxina T-2, DON. Los tricotecenos, zearalenona y fumonisinas además son las más relevantes para la salud humana y animal (Akande y col. y col., 2006).

Los tricotecenos se subdividen en 4 grupos básicos donde los grupos A y B son los más importantes. El grupo A de tricotecenos incluye las toxinas T-2 y HT-2, neosolaniol y diacetoxiscirpenol (DAS). El grupo B incluye DON (también conocido como vomitoxina), nivalenol y fusarenon-X.

Los productos agrícolas como el trigo, la cebada y el maíz pueden ser contaminados con significativos niveles de tricotecenos, principalmente con DON. Los tricotecenos son tóxicos tanto para las plantas como para los animales.

En aves las intoxicaciones crónicas que involucran toxina T-2 o DAS provocan una reducción del consumo de alimento y de la ganancia de peso, lesiones orales, necrosis de los tejidos linfoides, hematopoyético y mucosa oral, eventuales trastornos nerviosos (posición anormal de las alas, reducción de reflejos), emplume anormal y reducción del espesor de la cáscara de los huevos (Mallman, 2007).

Algunas cepas de *F. graminearum* y *F. culmorum* producen zearalenona, un metabolito problemático debido a su fuerte actividad hormonal (estrogénica) (Tabla 4).

*F. verticillioides*, *F. proliferatum* son productores de fumonisinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>, generalmente presentes en el maíz (Moss, 2002c) (Tabla 4).

### *Penicillium*

Miembros del género *Penicillium* generalmente crecen y pueden producir micotoxinas en un rango de temperaturas más amplio que el género *Aspergillus* (Omiski y col., 1994; Moss, 2002b). *Penicillium* es más abundante en climas templados y está comúnmente asociado con contaminación de granos almacenados más que “a campo” (CAST, 2003).

OTA y OTB son producidas también por *Penicillium.verrucosum*.

Patulina, producida principalmente por *P. expansum*, *P. urticae*, *A. clavatus* y *Byssochlamys nivea*, contamina frecuentemente los ensilados y puede reducir la digestión de las proteínas, fibras y materia orgánica, alterar la función ruminal y la producción de los ácidos grasos volátiles, provocando parálisis gástrica y muerte (Yiannikouris y Jouany, 2002b; Seglar, 2004).

*P. roqueforti*, contaminante frecuente de los ensilados es productor toxina PR y roquefortina, ambas toxinas tremorgénicas que causan éxtasis ruminal, trastornos digestivos y abortos (Whitlow, 1993). Estos trastornos son evidentes en los países europeos donde *P. roqueforti* predomina por sobre otras especies fúngicas (Adesogan, 2003).

En granos almacenados destinados a la alimentación del ganado son las aflatoxinas las toxinas registradas con más frecuencia en climas cálidos (Hell y col., 2000; da Silva y col., 2000; Whitlow y Hagler, 2009). Sin embargo, en la contaminación de forrajes de zonas templadas a frías, en las que el alimento almacenado es indispensable como refuerzo dietario, son las toxinas de *Fusarium* las que prevalecen. Entre ellas DON es la más frecuente (Driehuis y col. 2008).

## ¿CÓMO EVITAR EL DETERIORO DE UN SILO?

La conservación de alimentos por fermentación es un proceso complejo. Son muchos los factores exógenos que no pueden controlarse en su totalidad y si el producto resultante es de valor alimenticio deficiente la producción de leche, la ganancia de peso y la salud general de los animales se verán afectadas (Rees, 1997). Por esta razón hay una fuerte presión comercial para desarrollar técnicas que preserven la calidad del ensilaje.

### **Uso de inoculantes**

Se han ensayado diferentes métodos para mejorar la calidad del ensilaje contemplando la eficacia de la preservación y la eficiencia de conversión del alimento en productos animales.

La estabilidad aeróbica de un ensilado, definida como el periodo durante el cual la temperatura de la masa ensilada permanece estable después de la apertura del silo, constituye actualmente un indicador fundamental para garantizar la calidad y durabilidad del producto (Weiss, 1996; Muck, 2002). El ensilaje mal conservado puede propiciar el sobredesarrollo de microorganismos indeseables tales como bacterias patógenas (*Listeria* y enterobacterias), esporuladas (*Clostridium butyricum*, *C. botulinum* y *C. tyrobutyricum*), levaduras, hongos filamentosos y/o la producción de micotoxinas, y convertirse en un alimento peligroso para los animales (Wilkinson, 1999; McDonald y col., 1991; McDonald y col., 2002).

Al destapar el silo y mientras el pH se encuentre bajo, el crecimiento de microorganismos aeróbicos es lento. A medida que los ácidos orgánicos son catabolizados por estos microorganismos el pH va aumentando, originándose entonces un crecimiento microbiano exponencial y un rápido deterioro del material. La oxidación del ácido láctico es considerada como el paso inicial más importante de este deterioro, siendo las levaduras y las bacterias productoras de ácido acético, las principales responsables de esta oxidación (Rees, 1997).

Los aditivos han sido utilizados desde el siglo pasado para mejorar la conservación del ensilado con la idea de asegurar que las BAL dominen en la fase de fermentación. En la actualidad se conoce una amplia gama de aditivos para dirigir las rutas fermentativas en los procesos de ensilaje. Actualmente se dispone de un

gran número de aditivos químicos y biológicos comerciales Se pueden agrupar en tres tipos (Tabla 5) (Helmuth, 2008):

**Tabla 5:** Tipos de aditivos para ensilaje. Efecto más frecuente\*

Tipo de aditivo	Ingrediente activo típico	Observaciones	
Estimulantes de fermentación	BAL	Puede afectar la estabilidad aeróbica	
	Enzimas		
Nutrientes	Urea	Pueden mejorar la estabilidad aeróbica	
	Amoníaco		
	Azúcares (melaza)		
Inhibidores de la fermentación excesiva	Ac. lactico**	Inhibidores de deterioro aeróbico	
	Ac. fórmico**		
	Minerales		
	Acidos minerales		
	Nitritos		Inhibidor de clostridios
	Sulfitos		
	Cloruro de sodio		
	BAL		
	Acido propiónico**		
	Acido benzoico**		
Acido sórbico**			

\*Oude Elferink y col., 2001

\*\*o su sal correspondiente

#### a) Estimulantes de la fermentación

Este tipo de aditivos, muy utilizados en las últimas décadas, incluye inoculantes bacterianos y enzimas. Los inoculantes bacterianos promueven una fermentación más rápida y eficiente del material a ensilar, aumentando tanto la

cantidad como la calidad del ensilado. La introducción de enzimas permite liberar todo tipo de azúcares presentes en el forraje resultando en una mayor disponibilidad de los carbohidratos presentes para las bacterias.

*b) Fuentes de nutrientes*

Se adicionan carbohidratos como nutrientes para bacterias, por ejemplo: la melaza, urea o  $\text{NH}_3$  anhidro. El uso de  $\text{N}_2$  no proteico tiene por finalidad prolongar la estabilidad aeróbica durante la fase de extracción y adicionar una fuente económica de  $\text{N}_2$  a cultivos de bajo contenido proteico como el maíz. Los aditivos también pueden presentar inconvenientes como el requerimiento de grandes cantidades para obtener el resultado deseado o la presentación de efectos adversos. La melaza presenta un efecto positivo pero no específico, ya que estimula tanto a bacterias heterofermentativas como homofermentativas. El  $\text{NH}_3$  es un producto peligroso y difícil de usar debido a sus propiedades volátiles y cáusticas. Resulta más adecuado ingresarlo a la ración en forma de urea, pudiendo de esta forma tener un mayor control en la dieta. El  $\text{N}_2$  no proteico actúa como un amortiguador durante la fermentación, lo cual requiere que se produzcan cantidades extras de ácido láctico para reducir el pH lo suficiente como para lograr la preservación del ensilado.

*c) Inhibidores de la fermentación excesiva*

La finalidad de utilizar este tipo de aditivos es disminuir el pH, frenar la respiración de las plantas y evitar la proliferación de bacterias que provocan descomposición. Son aditivos que producen un efecto antimicrobiano, como ejemplo: ácidos propiónico, fórmico y sulfúrico. Se conocen sales que presentan capacidad con efecto benéfico en la preservación como nitritos, sulfitos y cloruro de sodio.

***Otros métodos de preservación***

**Control químico vs. control biológico**

Durante los últimos años se ha mejorado notablemente la calidad de los procesos de fermentación de ensilajes. Desafortunadamente lo mismo no puede decirse de la estabilidad aeróbica de los ensilados durante la etapa de alimentación (Honig y col., 1999). La mejoría en la eficiencia de fermentación implicó una reducción en la formación de ácidos butírico, propiónico y acético, naturalmente con actividad antimicótica. Por esta razón los ensilajes bien conservados se consideran

más susceptibles al deterioro aeróbico por crecimiento de levaduras y hongos, en comparación con los ensilajes que tuvieron procesos de fermentación más pobres (Cai y col., 1999; Wyss, 1999; Uriarte Archundia, 2004).

Las enfermedades de las plantas son una de las principales preocupaciones de los productores agrícolas. Se ha estimado que las pérdidas totales como consecuencia de patologías de los cultivos alcanzan el 25 % de la producción en países desarrollados y casi el 50 % en países en vías de desarrollo. De este porcentaje un tercio es debido a infecciones fúngicas (Bowyer, 1999).

Las plagas causan constantemente problemas porque llegan a sus hospederos naturalmente, por casualidad o intencionadamente. El crecimiento exponencial del comercio global y el aumento de la eficacia y la disponibilidad de viajes han aumentado el número de los parásitos o plagas exóticas que llegan a nuevas áreas cada año. Esto se ha convertido en un problema ecológico críticamente importante en el mundo entero (Badosa y col., 2006).

Existe una necesidad apremiante de controlar las enfermedades que reducen la disponibilidad de las cosechas y asegurar un suministro estable, constante y seguro de alimentos a la creciente población mundial. La práctica convencional para solucionar este problema ha sido el empleo de los agentes pesticidas químicos. Sin embargo el uso de estos controladores químicos presenta numerosos efectos adversos para la salud humana y animal. El suelo, el aire y las aguas, incluyendo las subterráneas, son susceptibles de la contaminación por compuestos tóxicos. Numerosos estudios han demostrado que los pesticidas tienen efectos crónicos en el hombre y en los animales afectando ciertos órganos o deteriorando su inmunidad (Gohel y col., 2006). Además pueden producir alteraciones en la ecología o en la sobrevivencia de las especies sobre las que no está enfocado el control químico (Cisneros, 1995; Wilson y Backman, 1998; Vero Mendez y Mondino, 1999). Los pesticidas paulatinamente se convirtieron en seleccionadores de poblaciones resistentes al producto utilizado. Ellos matan a los enemigos naturales de los patógenos provocando fenómenos de resurgencia de las plagas o de aparición de nuevas plagas. Así, la aplicación intensiva de biocidas termina dando resultados contrarios a los esperados. Las plagas se vuelven más resistentes, son más difíciles de combatir y esto hace que los costos de producción se incrementen (Hornby, 1990; Chet y col., 1997; Benitez y col., 1998).

El control de plagas con productos más inocuos es objeto de constantes estudios e investigaciones. Por ello resulta sumamente importante conocer y entender los complejos mecanismos relacionados a la interacción de las plagas con los productos del agro o con los microorganismos que intervienen en otros ecosistemas. El uso de microorganismos específicos, antagonistas del patógeno, que limitan la iniciación y propagación de una enfermedad y evitan las pérdidas causadas por el microorganismo nocivo, se conoce como control biológico (CB) (Clifford, y Cook., 1990; Duran Accino y Cazorla Lopez, 1996; Cabrifiga Olamendi, 2005; Ström y col., 2005). Se incluyen en este concepto no sólo los parasitoides, depredadores y patógenos de insectos y ácaros, sino también los fitófagos y patógenos de malezas así como feromonas, hormonas juveniles, técnicas autocidas y manipulaciones genéticas.

Otra definición de CB fue enunciada por Van Driesche y Bellows (1996) que expresa que "el control biológico es el uso de parásitos, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plagas, haciendo a ésta menos abundante y por lo tanto menos dañina". Considerando esta definición bastante amplia y que incluye todos los grupos de organismos con capacidad para mantener y regular densidades poblacionales de plagas a un nivel bajo, todos los organismos pueden considerarse potenciales agentes de CB y estar incluidos en la categoría de enemigos naturales (Pérez Consuegra, 2004).

El CB involucra a tres sistemas que interactúan y que además modifican el ambiente: hospedero, patógeno y agente de biocontrol.

El biocontrolador puede actuar a varios niveles en el ciclo de la enfermedad, interfiriendo en la supervivencia del patógeno, en el desarrollo del patógeno sobre la superficie del hospedador, en la entrada al hospedador (el antagonista puede competir con el patógeno en el tejido) y en la transmisión del patógeno entre los hospedadores.

Un organismo para ser usado como biocontrolador debe cumplir con las siguientes características (Wilson y Wisnewski, 1992; Cabrifiga Olamendi, 2005):

- Ser genéticamente estable
- Ser eficaz para un amplio rango de patógenos, aún a bajas concentraciones
- Poseer requerimientos nutricionales simples
- Sobrevivir en condiciones adversas

- Desarrollar en sustratos pobres
- No producir metabolitos potencialmente tóxicos para el hombre, animales o plantas
- Resistir a los pesticidas de uso frecuente
- Ser compatible con otros tratamientos químicos o físicos

Los agentes biológicos presentan diferentes características a los agentes de control químico (Tabla 6).

**Tabla 6.** Fungicidas biológicos vs. Químicos\*

Características	Agente	
	Químico	Biológico
Rango de actividad	Amplio	Limitado
Comienzo de su accionar	Inmediato	Gradual
Liberación del agente	Masiva	Pequeñas dosis (escala microbiana)
Desarrollo de resistencia	Si	No **
Efectos sobre el ambiente	Residuos peligrosos en agua, suelo y alimentos	Biodegradable, no contaminante
Efectos sobre los animales	Tóxico (especialmente para aves, peces y mamíferos)	No **
Efectos sobre los hombre	Tóxico y cancerígeno, inmunodepresor, altera la reproducción	No **

\*Gohel y col., 2006.

\*\* Desconocidos hasta la fecha

### **Búsqueda de biocontroladores**

El hallazgo de microorganismos benéficos como potenciales biocontroladores es un proceso de ensayo y error. La experiencia acumulada indica que fuentes útiles pueden provenir desde suelos supresivos de la enfermedad y plantas sanas de áreas endémicas hasta microorganismos de habitats lejanos al sitio de aplicación.

La capacidad biocontroladora no es atributo de un dado género o especie de microorganismos, sino que generalmente está limitado a la cepa aislada. Cepas de agentes de CB pertenecen a las familias Rhizobiaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae dentro de las bacterias Gram negativas y las familias Bacillaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae y Streptomyetaceae de las bacterias Gram positivas. También hay levaduras y hongos dentro de Ascomycota y Basidiomycota (Montesinos y Bonaterra, 2009).

### **Mecanismos de CB**

No es fácil determinar los mecanismos que intervienen en las interacciones entre antagonistas y patógenos. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y esto disminuye la posibilidad de resistencia del invasor. El riesgo de resistencia se reduce también mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Whipps, 2001).

Los efectos que los agentes de CB causan sobre el patógeno de plantas pueden ser: directos e indirectos. Los efectos directos comprenden: competición por nutrientes o espacio, parasitismo, predación, producción de antibióticos, enzimas líticas y enzimas inactivadoras del patógeno. Los efectos indirectos incluyen todos aquellos mecanismos que de alguna manera pueden producir cambios morfológicos o bioquímicos en el hospedero como tolerancia al stress, mejora en el desarrollo de la raíz y de la planta, solubilización o secuestro de sustancias nutritivas inorgánicas y resistencia inducida (Viterbo y col., 2002).

*Competencia:* Se fundamenta en el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, teniendo en cuenta que antagonista y patógeno están muy relacionados. Es un mecanismo comúnmente utilizado para controlar hongos (Muslim y col., 2003). Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento. La competencia más común es

por nutrientes, oxígeno o espacio. Un ejemplo claro es el uso de *Fusarium* sp, no patógeno, para controlar el marchitamiento foliar causado por otros hongos. Ambos compiten por el mismo sitio de infección y por los mismos nutrientes (Muslim y col., 2003; Gohel y col., 2006). *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* son dos hongos de postcosecha, necrotróficos. Sus conidios requieren nutrientes exógenos para poder germinar y promover el desarrollo hifal para penetrar en el sustrato. De manera similar las levaduras son efectivas colonizadoras de la superficie de plantas y producen materiales extracelulares (en especial polisacáridos) que restringen el espacio para la colonización por los patógenos antes mencionados (Droby y col., 1991; Wilson y col., 1996; Wilson y Droby, 2001).

*Parasitismo*: Consiste en la utilización del patógeno como alimento casi exclusivo de su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas,  $\beta$  1-3-glucanasas y proteasas que lisan las paredes de las hifas, conidios o esclerotes (Ulhoa, 1996).

Se ha demostrado que muchas bacterias, hongos y levaduras como *Bacillus*, *Pantoea*, *Streptomyces*, *Gliocladium*, *Trichoderma* y *Pichia*, presentan capacidad para parasitar y degradar la pared celular de filamentos y conidios fúngicos causantes de patologías en plantas. Entre ellos *Bacillus cereus* y *Pantoea agglomerans* son productores de enzimas quitinolíticas implicadas en biocontrol de patógenos fúngicos (Bonaterra y col., 2003; Chang y col., 2003, Frances y col., 2006). Cepas del género *Trichoderma* han sido muy estudiadas como parásitos de patógenos de suelos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* y existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de ellos (Montesinos y Bonaterra, 2009).

*Predación*: En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. El control biológico puede llevarse a cabo desde el control natural en suelos que posean la capacidad de no desarrollar una enfermedad (suelos supresivos). Los reportes más conocidos citan la presencia de *Entamoebas* en suelos supresivos de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Campbell, 1989).

*Inducción de resistencia:* Las plantas como otros seres vivos del planeta han evolucionado desde su aparición por lo que han desarrollado diferentes mecanismos de defensa contra sus agresores. Se han desarrollado técnicas que inducen resistencia como pequeñas dosis de luz UV (agentes abióticos), el agregado de compuestos naturales, el uso de organismos antagonistas (agentes bióticos). Esta respuesta implica la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas-PR) como fenol oxidasas, peroxidasas y polifenoloxidasas (Nicholson y Hammerschmidt, 1992; Wojtaszek, 1997) y enzimas como: 1,3 glucanasas, quitinasas, -1,4 glucosidasas y N-acetilglucosaminidasas (Heil y Bostock, 2002). Algunas bacterias y hongos son capaces también de inducir resistencia por producción de elicitores (componentes de la pared celular) o moléculas mensajeras (ácido salicílico). Se ha descrito un nuevo mecanismo por el cual bacterias pueden degradar mensajeros de señales químicas necesarios para *quorum sensing* (acil homoserina lactona) usados por muchos patógenos vegetales como iniciadores del proceso de infección (Montesinos y Bonaterra, 2009).

*Antibiosis:* Es el mecanismo de antagonismo entre microorganismos más estudiado. Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm) (Whipps, 2001; Raaijmakers y col., 2002). Si bien este proceso puede generar algún tipo de resistencia en el patógeno, la liberación de una sustancia a escala microbiana es menos nociva que el uso masivo de agroquímicos (Tabla 6) (Vero Mendez y Mondino, 1999; Gohel y col., 2006). Existen numerosas cepas microbianas aisladas de suelos y de hospederos vegetales, productores de antibióticos *in vitro*.

La antibiosis contra hongos y bacterias fitopatógenos puede originarse por la producción de opinas (derivado tóxico de aminoácidos) en *Agrobacterium radiobacter*, compuestos antifúngicos fenólicos en especies de *Pseudomonas*, peptidos y polienos antimicrobianos en *Bacillus* y *Actinomycetes*, o enzimas líticas en hongos y levaduras como *Trichoderma* y *Candida* (Gohel y col., 2006; Ojiambo y Schern; 2006; Raaijmakers y col., 2008). Enzimas extracelulares como quitinasas y glucanasas interrumpen la síntesis de la pared fúngica y la elongación hifal, mecanismos por los que protegen al tejido vegetal de una posible colonización

fúngica (Vaidya y col., 2001; Gohel y col., 2006). *Trichoderma*, muy estudiada como agente de CB de hongos fitopatógenos, degrada enzimáticamente la pared celular por liberación de quitinasas, proteasas y glucanasas.

Otra estrategia similar es la de producción de péptidos antifúngicos. La diversidad de mecanismos de acción contra los patógenos de las plantas es lo que hace que los péptidos resulten tan atractivos como agentes de biocontrol. (Monteiro y col., 2003; Montesinos, 2007). Algunos presentan actividad frente a uno o más patógenos, inhibiendo la elongación de la hifa, limitando la infección desde el comienzo. Otros péptidos antimicrobianos actúan alterando la membrana del patógeno por mecanismos mediados por receptores catiónicos o penetran a la célula inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos o de proteínas.

En la Tabla 7 se muestran algunos microorganismos que sintetizan metabolitos secundarios de interés en el control de patógenos de plantas producidos por síntesis no ribosomal, conocidos como pseudopéptidos. Entre ellos el género *Streptomyces* presenta metabolismo secundario muy complejo (Madigan, 2005). Las polimixinas, producidas por *Streptomyces cacaoi*, se utilizan comercialmente como biocontroladores fúngicos en vegetales. Estos compuestos son dipéptidos de pirimidilo que inhiben la síntesis de quitina en hongos como *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (Montesinos, 2007).

**Tabla 7:** Pseudopéptidos activos frente a patógenos de plantas\*

	Composición	Microorganismo productor
Pantocinas A y B	Alanina derivatizada	<i>Pantoea agglomerans</i>
Polimixinas	Pirimidil – dipéptido	<i>Streptomyces cacaoi</i>
Nikomocinas (simil Polimixinas)	Pirimidil – dipéptido	<i>Streptomyces tendae</i>
Bacilisina	Epoxiciclohexano dipéptido	<i>Bacillus subtilis</i>
Blastieldina	Nucleopeptido	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>

\*Montesinos, 2007

Si bien la competición entre los organismos es uno de los factores que determinan la densidad de las poblaciones naturales, existen microorganismos que

además producen sustancias (antibióticos, enzimas, etc.) que afectan la viabilidad y capacidad de diseminación de los hongos toxicogénicos.

### ***Streptomyces* como agente de biocontrol**

Los actinomicetes naturalmente se encuentran presentes en el suelo. Se ha comprobado que cepas de *Streptomyces*, aisladas del mismo ecosistema, son capaces de producir compuestos antibióticos que inhiben o reducen el desarrollo de patógenos de plantas (Kim y col., 1999; Ouchdouch, 2001)

La familia *Streptomycetaeae* en sus orígenes (1943) estaba conformada por un solo género: *Streptomyces*. En 1997 fue incorporado un nuevo género: *Kitasatospora* y en 2003 se sumó a la familia el género *Streptoacidiphilus* (Kämpfer, 2006).

Son bacterias BGP aerobias, con un contenido de (G+C) de  $69 \pm 78\text{mol}\%$ . Presentan hifas largas y ramificadas, con un diámetro de  $0,5 - 2,0 \mu\text{m}$  que raramente fragmentan.

El género *Streptomyces* presenta la característica de producir esporos en forma endógena, por segregación del protoplasma, en cuerpos cilíndricos u ovals. Las cadenas de esporos son generalmente espiraladas (Kämpfer, 2006).

Son quimiorganotrofos, productores de catalasa y pueden reducir nitrato a nitrito. Muchos pueden degradar compuestos complejos como caseína, gelatina, hipoxantina, almidón y celulosa. Además pueden utilizar muchos compuestos orgánicos como única fuente de carbono para obtener energía y crecer. La temperatura óptima de desarrollo para muchas de sus especies está entre  $25$  y  $35^\circ\text{C}$ . El pH óptimo está entre  $6,5$  y  $8,0$  (Kämpfer, 2006).

Las bacterias de género *Streptomyces* son muy abundantes en el suelo. Muchos miembros de esta familia prefieren los suelos neutros o alcalinos. Otros utilizan suelos ácidos como hábitat natural. Se los encuentra entre los principales productores de compuestos bioactivos y de enzimas extracelulares. Pueden liberar a su entorno enzimas que le permiten utilizar materiales orgánicos como algodón, lana, hidrocarburos y goma. Además pueden degradar polímeros naturales como lignina (Anderson y Wellington, 2001; Madigan, 2005; Kämpfer, 2006).

Muchos de los antibióticos de uso clínico como por ejemplo neomicina, cloranfenicol son el resultado del metabolismo secundario de este género (Kieser y col., 2002).

Su efectividad como agente de biocontrol ha sido probada contra bacterias, hongos y algunos protozoos y nematodos (Dicklow y col., 1993; Coelho y col., 1995; Trejo-Estrada y col., 1998; Kim y col., 1999; Ouchdouch y col., 2001).

### **Control biológico de hongos toxigénicos**

El empleo de agentes biocompetitivos para el control de hongos toxigénicos es una práctica muy estudiada en la actualidad. Un ejemplo claro es la utilización de cepas atoxigénicas de *A. flavus* para el control de cepas productoras de aflatoxinas o ácido ciclopiazónico (Cotty, 2006). *A. flavus* atoxigénico es uno de los agentes fúngicos más estudiados para el control de cepas toxigénicas (Cotty, 2006; Pitt y Hocking, 2007). Estos microorganismos presentan alta capacidad para adaptarse al ambiente en el que se encuentran las cepas toxigénicas. Este tipo de estrategia se ha descrito para controlar pestes en sustratos como algodón, maní y maíz. Además presentan una serie de ventajas: escasa interferencia con el medio ambiente, sin manipulación genética y el producto no es rechazado por el consumidor (Soriano del Castillo, 2007).

Otros autores han utilizado bacterias como biocontroladores de hongos productores de toxinas. Munimbazi y Bullerman (1998) estudiaron la influencia ejercida por *Bacillus pumilus* sobre *Aspergillus* productores de AF. Si bien este biocontrolador sólo detuvo el desarrollo hifal en un 45%, la producción de AF disminuyó en un 99%. El compuesto produjo la inhibición de la germinación de los conidios de *Aspergillus* y la elongación hifal (Bottone y Peluso, 2003).

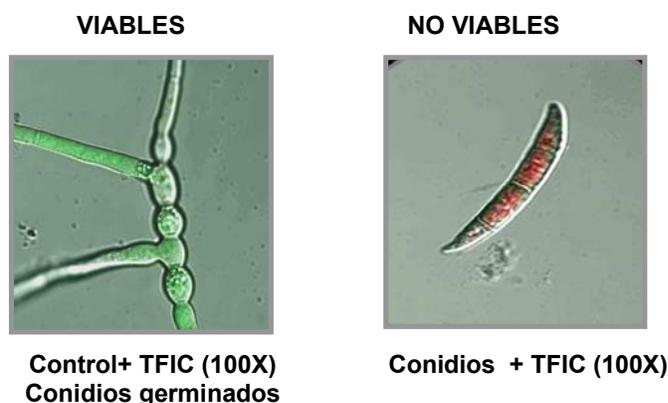
Pereira y col. (2007) comprobaron la capacidad de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Microbaterium olveovorans* para disminuir la densidad poblacional de *Fusarium verticillioides* y la acumulación de fumonisinas en maíz.

También ha sido reportada la inhibición de hongos toxigénicos por compuestos producidos por cepas de *Streptomyces*. Sin embargo las publicaciones que registran el control de hongos toxicogénicos por *Streptomyces* son muy pocas. Entre ellos se han caracterizado 3 compuestos proteicos de PM<15kDa: AFP1, SKLP Y TFIC.

AFP1, es producida por *S. tendae*, fue la primera proteína antifúngica aislada a partir de *Streptomyces*. Su actividad antifúngica se relaciona con la capacidad de penetrar en la pared fúngica ya que presenta pequeño tamaño y unirse a la quitina. Presenta un espectro de acción limitado casi exclusivamente al género *Aspergillus* (Bormann y col., 1999).

SKLP, producida por *Streptomyces* sp.F-287. Toma su nombre de **Streptomyces Killer Like Protein**. Produce alteraciones morfológicas en levaduras y hongos filamentosos (Hiraga y col., 1999; Ohki y col., 2001).

TFIC, Como parte de un screening de cepas de *Streptomyces* aisladas de suelo fue seleccionada, *Streptomyces* C/33-6) con actividad inhibidora de la germinación de conidios de *A. parasiticus*, *F. graminearum* y *F. tricinctum* (Borghini y col., 1988; Fulgueira y col., 1989; Borghini y col., 1992). Esta cepa no presentó efecto citocida frente a otras BGP de bajo contenido (G+C). En experiencias llevadas a cabo en invernadero sobre plantas de trigo se determinó que el *Streptomyces* aislado evitó la colonización fúngica y sus efectos, disminución en peso de granos y producción de micotoxinas (Fulgueira y col., 1996; Fulgueira, 1998). En estudio posteriores se determinó que dicha actividad es producida por un compuesto proteico de 14kDa, TFIC, por **Toxigenic Fungi Inhibitor Compound** (Acosta, 2005). Por microscopia confocal y uso de colorantes fluorescentes, se demostró que TFIC presenta un efecto citocida no queratinolítico frente a conidios de hongos toxigénicos (Fig 10) (Acosta, 2005).



**Fig 10:** Microscopia de fluorescencia confocal con Diacetato de fluoresceína - Bromuro de etidio de conidios.

Un antimicótico, pimaricina (producido por *Streptomyces notalensis*), fue ensayado por Woolford y col. (1980) quienes encontraron que este compuesto es eficaz para conservar la estabilidad aeróbica de silaje (Rees, 1997).

Existen también otros reportes de cepas de *Streptomyces* que disminuirían la contaminación con micotoxinas por distintos mecanismos. Entre ellos se encuentra el aflastatin un compuesto inhibidor de la producción de micotoxinas cuya fórmula molecular es  $C_{62}H_{115}NO_{24}$ . Aflastatina produce alteración y reducción de la elongación de las hifas de *A. parasiticus* NRRL 2999 productor de aflatoxina. Además de inhibir completamente la producción de aflatoxinas tanto en medio líquido como sólido (Ono y col., 1997). Aflastatina presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias, levaduras y otros hongos filamentosos.

Bressan y Fontes Figueiredo (2008) demostraron la efectividad de 2 cepas de *Streptomyces* como agentes de biocontrol de *F. verticillioides* patógeno de maíz en condiciones de invernadero. El efecto inhibidor fue independiente de la concentración del patógeno. Si bien estas cepas de *Streptomyces* controlaron al patógeno por la producción de compuestos bioactivos también competían por la fuente carbonada.

*Objetivos*

La obtención de ensilaje de elevada calidad y valor nutricional requiere optimizar, entre otros aspectos, la densidad, humedad y el contenido de azúcares solubles en agua. La reducción o pérdida del valor nutricional del material ensilado durante su almacenamiento ocurre principalmente debido al desarrollo de hongos. Según Garon y col. (2006), los principales factores asociados con el deterioro son: temperatura, humedad e infección por insectos.

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. Aunque tiene sus condicionantes y problemas, resulta preferible a otros métodos de conservación, ya que permite 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. Además, facilita la mecanización de las explotaciones, ya que los procesos de recolección, realización y distribución del ensilado, pueden ser íntegramente mecanizados.

En los ensilados la acumulación de ácido láctico da por resultado una disminución de pH que junto a la disminución de O<sub>2</sub> inhiben el metabolismo y proliferación microbiana preservando así la calidad de los nutrientes.

La FAO ha estimado que un 25% de la producción cerealera mundial se encuentra contaminada con micotoxinas. Esta estimación se traduce a billones de dólares en la producción de ensilados.

Es claro que la prevención de la contaminación fúngica de cereales y oleaginosas es la mejor estrategia para su control, fundamentalmente en el caso de cepas productoras de micotoxinas. El control biológico ofrece menor exposición a pesticidas potencialmente tóxicos y en consecuencia un menor riesgo de polución ambiental que el control químico.

Este Trabajo de Tesis tuvo por objeto estudiar las reservas de alimentos para el ganado productor de carne y leche desde un punto de vista toxicogénico, tema de gran importancia económica y social para la República Argentina.

Se planteó la siguiente **hipótesis**: “*Streptomyces* es un buen biocontrolador de hongos toxigénicos en forrajes conservados”. Para comprobarla se propusieron los siguientes objetivos y actividades:

1. Conocer el grado de contaminación de los alimentos destinados al consumo animal de la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe.
  - Recuento, aislamiento e identificación de la flora fúngica contaminante de forrajes conservados. Correlación de las características nutritivas y fermentativas de los ensilados con dicha contaminación.
2. Proponer una metodología rápida y económica que permita conocer los riesgos de su uso. Buscar marcadores de la contaminación fúngica.
  - Determinación de la presencia de aflatoxinas totales y DON (posibles marcadores de contaminación fúngica) en las muestras de alimentos.
3. Buscar microorganismos biocontroladores que *in vitro* permitan restringir la presencia de hongos toxigénicos y patógenos para la salud humana y animal.
  - Aislamiento de cepas de *Streptomyces* spp. de muestras de suelo de cultivos.
  - Aislamiento de cepas de bacterias lácticas de muestras de silos de buena calidad.
  - Estudio de la capacidad productora de aquellas micotoxinas de importancia para la salud humana y animal de los aislados pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, y *Fusarium*.
  - Ensayo del efecto antagonista de los aislados de *Streptomyces* spp. y bacterias lácticas contra las cepas fúngicas toxicogénicas y patógenas.
4. Aplicar el/los microorganismos seleccionados *in vitro* en microsilos experimentales a campo en buenas y malas condiciones de conservación
  - Prueba del efecto de las cepas de *Streptomyces* spp. y bacteria láctica con mayor actividad antagonista sobre los hongos toxicogénicos aislados, inoculados en microsilos experimentales en condiciones apropiadas e inapropiadas de almacenamiento.

*Materiales y métodos*

## MICROORGANISMOS Y METODOLOGÍA UTILIZADA

### Microorganismos utilizados

A continuación se detallan las cepas fúngicas y bacterianas utilizadas en este trabajo (Tabla 8)

**Tabla 8:** Microorganismos utilizados

Microorganismo	Procedencia	Característica
Cepas fúngicas		
<i>A. parasiticus</i> 5M43	Forraje de maíz	Productor de aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub>
<i>A. fumigatus</i> 15M7	Forraje de maíz	Patógeno humano y animal
<i>A. fumigatus</i> 16M49	Forraje de sorgo	Patógeno humano y animal
<i>A. flavus</i> 12 M13	Forraje de maíz	Productor de Aflatoxinas B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub>
<i>F. graminearum</i> ITEM 124 <sup>2</sup>	Colección de cultivo	Productor de DON y ZEA
<i>F. proliferatum</i> 4 M2	Rollo alfalfa	Productor de fumonisina B <sub>1</sub>
<i>F. proliferatum</i> 7 M12	Forraje de sorgo	Productor de fumonisina B <sub>1</sub>
<i>F. sporotrichioides</i> NRRL 3299 <sup>1</sup>	Colección de cultivo	Productor de toxina T-2 y HT-2
<i>F. proliferatum</i> NRRL 26191 <sup>1</sup>	Colección de cultivo	Productor de Fumonisinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> y B <sub>3</sub>

**Cepas bacterianas**

*Streptomyces* sp Suelo de cultivo de cereales Productor de proteínas antifúngicas

C/33-6<sup>3</sup>

*Lactobacillus* Silos de maíz Inhibidor de cepas fúngicas

*buchneri* BAL/7<sup>3</sup>

1 Agricultural Research Service Culture Collection (National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, U.S.).

2 Istituto di Tossine e Micotossine di Parassiti vegetali (Bari, Italia).

3 Centro de Referencia de Micología, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. (Rosario, Argentina).

**Medios de cultivos y soluciones utilizados**

Los reactivos utilizados se presentan en la Tabla 9

**Tabla 9:** Composición de medios de cultivos y soluciones empleados

<b>Medios de cultivos y soluciones utilizados</b>	<b>Composición</b>
Agua peptonada (pH7) (Pitt y Hocking, 1999)	Cloruro de sodio 5g Peptona 10g Agua cps 1000ml
Agua fenolada (Panthier y col., 1979)	Fenol 631mg Agua destilada csp 1000ml
Colorante Gueguen (Azul de algodón) (Hoog y col., 2000)	Ácido láctico 100g Sudán III 0.1g Azul de algodón 0.1g Soluc.alcohólica de Yodo 10-20 gotas

---

Líquido de montar

---

(Hoog y col., 2000)

Glicerina 40g  
Ácido láctico 20g  
Fenol cristalizado 20g  
Agua destilada 20ml

---

*Aspergillus flavus parasiticus* agar (AFPA)

---

(Pitt y Hocking, 1999)

Peptona 5mg  
Extracto levadura 10g  
Citrato amonico férrico 0,5g  
Cloranfenicol 100mg  
Dicloran 2mg (0,2%P/V en etanol)  
Agar 15g  
Agua destilada csp 1000ml

---

Caldo papa glucosa PD caldo)

---

(Hawksworth y col., 1996)

**Glucosa 40mg**  
CaCO<sub>3</sub> 0,4g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,4g  
Papas 200g /500ml  
Agua destilada csp 1000ml

---

Agar papa glucosa (APD)

---

(Hawksworth y col., 1996)

Caldo PD 1000ml  
Agar 16g

---

APD soft

---

(Hoog y col., 2000)

Caldo PD 1000ml  
Agar 8g

Dicloran rosa de bengala cloranfenicol agar-(DRBC)

---

(Pitt y Hocking, 1999)

Glucosa 10g  
Peptona 5g  
Fosfato monobásico de potasio 1g  
Sulfato de magnesio 0.5g  
Rosa de Bengala 25mg  
Diclorán 2mg  
Cloranfenicol 100mg  
Agar 15g  
Agua destilada csp 1000ml

Czapeck solución concentrada (CzS)

---

(Hoog y col., 2000)

Na NO<sub>3</sub> 30g  
KCL 5g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5g  
Fe SO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0.1g  
Agua destilada csp1 00ml

Czapeck agar

---

(Hoog y col., 2000)

Sacarosa 30g  
Agar 15g  
CzS 10ml  
Agua destilada csp 100ml

Czapeck iprodione dicloran agar (CZID)

---

(Pitt y Hocking., 1999)

**Sacarosa 30g**  
Extracto de levadura 5g  
Cloranfenicol 100mg  
Dicloran 2mg  
CzS 10ml  
Solución trazas de metal 1ml  
Agar 15g  
Iprodione suspensión 1ml  
H<sub>2</sub>O destilada csp1000ml

Medio G1

---

(Bu'lock y Chulze, 1990)

Glucosa 20g  
Extracto de levadura 5g  
Agar 20g  
Agua destilada csp 100ml

Medio YES

---

(Scott y col., 1970)

Extracto de levadura 10g  
Sacarosa 100g  
Agua destilada csp 500 ml

MRS caldo

---

(de Man y col., 1960)

Proteosa peptona N3 10g  
Extracto de levadura 4g  
Extracto de carne 8g  
Dextrosa 20g  
Sorbitan monoleato 100ml  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g  
NaAc 5g  
MgSO<sub>4</sub> 0.20g  
MnSO<sub>4</sub> 0.05g  
Citrato de amônio 2.00  
Agua destilada csp 1000ml

MRS agar

---

(de Man y col., 1960)

MRS caldo 1000ml  
Agar 10g

Agar sintético nutritivo (SNA)

---

(Hoog y col., 2000)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g  
KNO<sub>3</sub> 1g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5g  
KCl 0,5g  
Sacarosa 0,2g  
Agar 20g  
agua destilada csp 1000ml

## Técnicas y bioensayos utilizados

### Detección de micotoxinas en forrajes

Se detectaron y cuantificaron Aflatoxinas totales (AF) y Deoxinivalenol (DON) con equipos comerciales según especificaciones del fabricante:

Detección de aflatoxinas:

Romers AgraQuant R Aflatoxinas Totales (límite de detección 1  $\mu$ /kg)

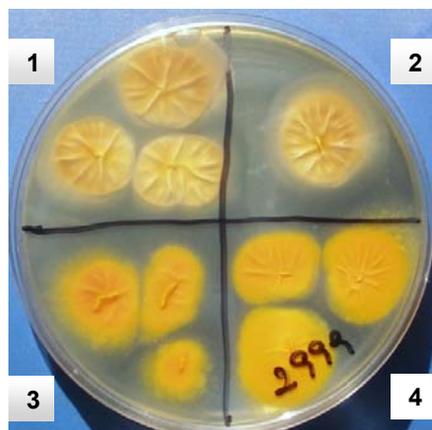
Detección de DON:

Biopharm Ridascreen Fast DON R5906 (límite de detección 74  $\mu$ /kg).

### Aislamiento, recuento e identificación de la flora fúngica

Para el aislamiento y recuento de la flora fúngica presente en forrajes conservados se utilizó la técnica de Pitt y Hocking (1999): A 90ml de agua peptonada se le adicionó 10g de muestra triturada en molinillo estéril. Se colocó en agitador mecánico (110golpes/min) durante 10min. De esta suspensión se realizaron diluciones sucesivas  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  en agua peptonada y 100 $\mu$ l de cada una de ellas fueron sembradas sobre placas de DRBC y CZID. Las placas sembradas fueron incubadas a 25 °C durante 5 días.

Para el aislamiento de *Aspergillus* grupo *flavus* posible toxigénico se utilizó AFPA como medio diferencial sobre el que se inocularon las diluciones preparadas. Las placas inoculadas fueron incubadas a 30°C durante 48hs. La presencia de coloración amarilla naranja en el reverso de las colonias permite la identificación presuntiva de *Aspergillus flavus/parasiticus* (Fig 11).



- 1: cepa incógnita negativa.
- 2: cepa control negativo.
- 3: cepa incógnita positiva.
- 4: cepa control positivo *A. parasiticus* NRRL2999

**Fig 11:** Desarrollo de cepas del género *Aspergillus* en medio AFPA

Para la identificación de las cepas aisladas se utilizaron diferentes claves taxonómicas:

- Hoog y col. (2000) clave general
- Pitt y Hocking (1999) para *Aspergillus* y *Penicillium*
- Nelson y col. (1983) para *Fusarium*
- Ellis (1971) para hongos demateáceos

### **Preparación de suspensiones fúngicas**

Preparación de inóculos fúngicos

Las cepas de *Aspergillus* fueron sembradas en APD e incubadas a 28°C durante 7 días, las cepas de *Fusarium* fueron sembradas en SNA y crecidas a 28°C 10 días.

A partir de los desarrollos se prepararon suspensiones en agua destilada estéril. Se realizó el recuento de los propágulos presentes en cámara de Neubauer. La concentración final del inóculo fue ajustada con agua destilada de acuerdo a las necesidades.

### **Estudio de la capacidad toxigénica de los hongos aislados**

En todos los casos se evaluó la producción de micotoxinas por cepas en estudio, procesándose en paralelo una cepa de colección con capacidad toxigénica comprobada.

Producción de aflatoxinas

Se ensayó la capacidad productora de aflatoxinas de las cepas del grupo *Aspergillus flavus/parasiticus* por la técnica de Scott (1972) modificada por Fulgueira (1998). En tubos conteniendo 5ml de medio YES se sembraron  $10^6$  conidios del hongo en estudio y se incubaron a 28°C durante 7 días. El micelio desarrollado fue separado por filtración. El filtrado fue extraído con dos alícuotas de 5ml de cloroformo en ampolla de decantación. La fase clorofórmica fue secada a través de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y evaporada a sequedad en rotavapor, Buchi a 60°C.

El residuo fue suspendido en 200µL de cloroformo y desarrollado en cromatografía de capa delgada (TLC) utilizando cromatofolios de sílica gel 60G (Merck art 5553) y soluciones patrones Sigma de las 4 aflatoxinas. La cromatografía fue desarrollada utilizando como solvente de corrida cloroformo–acetona (90:10V/V) en cubas de vidrio insaturadas. Una vez desarrollada, la placa fue secada a

temperatura ambiente. La presencia de las AF fue detectada con luz UV a 366nm y posteriormente confirmada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25% V/V.

#### Producción de toxina T<sub>2</sub>

Para la evaluación de la producción, suspensiones de 10<sup>6</sup> conidios de las cepas de *Fusarium* potencialmente productoras, fueron sembradas en medio G<sub>1</sub> (Bu`lock y Chulze de Gómez., 1990). Luego de 7 días a 28°C, el desarrollo fúngico fue detenido con el agregado de cloroformo y el micelio fue separado por filtración. La extracción de las toxinas fue realizada en ampolla de decantación agregando 2 alícuotas de 5ml de cloroformo al filtrado. Las fracciones clorofórmicas fueron combinadas y secadas a través de Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> anhidro y evaporada a sequedad en rotavapor a 60°C.

El residuo fue redisolto con 200µL de cloroformo y desarrollado en TLC. Para la detección de toxina T<sub>2</sub> fue utilizado benceno-acetona (3:2V/V) como solvente de corrida. Dicha toxina fue revelada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20% V/V bajo luz UV larga (366 nm) y posteriormente confirmada por calentamiento a 110°C durante 7 minutos (Fulgueira, 1998).

#### Producción de zearalenona y deoxinivalenol

La capacidad de producción de zearalenona y DON fue evaluada por la técnica de Lori y col. (1992). Para la producción se utilizaron erlemeyers conteniendo 50g de arroz pelado y pulido, previamente hidratado con agua 1h, escurrido y esterilizado a 121°C durante 20min a los que se les adicionó 5ml de una solución de peptona al 10%. Inóculos conteniendo 5x10<sup>6</sup> conidios de las cepas de *Fusarium* aisladas fueron sembrados en los erlenmeyers con arroz. Los cultivos fueron incubados a 25°C durante 20 días y posteriormente secados en estufa a 70°C durante 24hs. La extracción de las toxinas fue realizada según la técnica de Bottalico y col. (1983). Para la extracción se agregaron 200ml de una mezcla de metanol:agua (60:40 V/V), se agitó durante 10 minutos en agitador mecánico (110 golpes/min) y durante 1 minuto en licuadora a baja velocidad. Posteriormente se filtró a través de papel de filtro utilizando bomba de vacío. 40 ml del filtrado fueron extraídos con 32ml de hexano adicionados de 1g de NaCl. La fase metanólica fue extraída 2 veces con cloroformo (30 y 20ml respectivamente). La capa clorofórmica fue filtrada a través de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y

evaporada a sequedad en rotavapor. El residuo fue redissuelto en 200µL de cloroformo y analizado por TLC.

Para el análisis de ZEA la TLC fue desarrollada en cloroformo:acetona (9:1V/V). La misma fue detectada presuntivamente bajo luz UV corta (254nm). Para su confirmación la placa fue rociada con AlCl<sub>3</sub> 20% P/V (en etanol:agua 1:1V/V), calentada 7min a 110°C y observada bajo luz UV larga (366nm). Límite de detección: 100µg/Kg.

Para DON se empleó como solvente de desarrollo una mezcla de benceno:acetona (3:2 V/V), usándose como reactivo revelador AlCl<sub>3</sub> 20% P/V (etanol:agua 1:1V/V) con posterior calentamiento a 110°C durante 7 minutos (Fulgueira, 1998). Estas condiciones permiten observar la toxina bajo luz UV larga (366 nm). Límite de detección: 100µg/Kg.

#### Producción de fumonisinas

La producción de fumonisinas por aislados de *F.verticillioides* y *F. proliferatum* fue evaluada por la técnica de Basílico y col. (1996). En erlemeyers de 500ml se colocaron 100g de maíz previamente hidratado con 20 ml de agua destilada durante 8hs y esterilizados 20min a 120°C. Sobre la superficie del maíz se inocularon suspensiones 10<sup>7</sup> conidios del hongo en estudio. Se homogenizó manualmente la mezcla y se incubó a 25°C durante 25días.

Para la extracción de la fumonisinas se utilizó una mezcla de metanol-agua en una relación 70/30 (V/V). El dosaje de la toxina producida fue realizado por la técnica de ELISA R5602 Ridascreen Fast Fum de acuerdo a las especificaciones del fabricante con un límite de detección 222µg/kg.

#### **Aislamiento e identificación de potenciales biocontroladores**

##### Aislamiento, recuento e identificación de *Streptomyces*

El aislamiento de cepas de *Streptomyces* se realizó utilizando la técnica de Panthier y col. (1979) a partir de muestras de suelo (campos de producción de cereales, campos sin labranza y huertas orgánicas) de la zona sureste de la provincia de Santa Fe.

Las muestras de 10g de suelo fueron molidas en mortero estéril adicionando una pequeña alícuota de agua. Este homogenizado fue transferido a un erlemeyer con 90ml de agua fenolada. La suspensión fue agitada 10min en agitador mecánico (110 golpes/min). Se realizaron diluciones sucesivas  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  en agua. Alícuotas de 100 $\mu$ l de cada una de ellas fueron sembradas sobre placas de APD adicionado con cicloheximida (200mg/l). Las placas fueron incubadas a 28°C durante 7 días.

Se realizó el estudio macro y micromorfológico de las colonias desarrolladas. Aquellas que presentaron características compatibles con el género *Streptomyces* fueron inoculadas en APD e incubadas durante 7días a 28°C. Se realizaron suspensiones de esporos en caldo PD adicionado con glicerina en csp 20% V/V. Las suspensiones fueron conservadas a -20°C para estudios posteriores (Korn-Wendisch y Kutzner, 1992; Williams y col., 1989).

#### Aislamiento, recuento e identificación de cepas BAL

Muestras de 10g de silos de buenas condiciones destinados al consumo animal fueron diluidas en 90ml de agua peptonada estéril. La suspensión fue agitada 10min en agitador mecánico (110 golpes/min). Se realizaron diluciones sucesivas  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  en agua peptonada. Alícuotas de 100 $\mu$ l de cada una de ellas fueron sembradas en agar MRS. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 7 días en bolsas de anaerobiosis BioMerieux Ref 45534. A las colonias con macro morfología de BAL se les realizó coloración de Gram (G), y prueba de catalasa (Cat) en portaobjeto. Se seleccionaron todas aquellas cepas que resultaron cocos o bacilos G(+) y Cat(-). Las cepas fueron conservadas en caldo MRS glicerinado al 20% V/V, a -20°C.

#### Identificación molecular de Lactobacilos

Para la identificación taxonómica de lactobacilos se realizaron los siguientes ensayos en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA):

- Extracción de ADN cromosómico
- Amplificación de la región de ADN codificante para la región variable VI del ARN 16S mediante PCR.
- Purificación del fragmento obtenido (500pb)

- Secuenciación
- Análisis de la secuencia

### Preparación de inóculos bacterianos

Las cepas de *Streptomyces* fueron sembradas sobre APD. Los cultivos fueron incubados a 28°C 7 días. A partir de ellos se prepararon suspensiones de esporos.

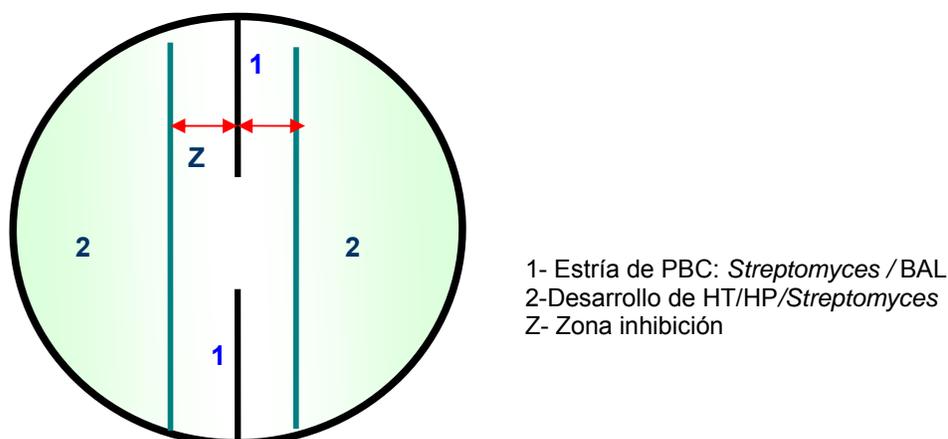
Las cepas de BAL fueron inoculadas “overnight” en caldo MRS e incubadas a 37°C.

Se realizó el recuento de células bacterianas en cámara de Neubauer y la concentración final del inóculo fue ajustada con agua destilada de acuerdo a los requerimientos de la técnica utilizada.

### Pruebas de Interacción entre hongos toxigénicos/patógenos (HT/HP) y potenciales biocontroladores (PBC)

#### Ensayos de interacción *Streptomyces* – HT/HP

Cada uno de los *Streptomyces* aislados fue sembrado por estrías en placas de APD e incubado 48h a 28°C. A cada una de las placas se las inoculó por rociado con una suspensión  $10^6$  conidios/ml de cada HT/HP. Luego de 7 días de incubación a 28°C se registró el diámetro de las zonas de inhibición (Z) producidas por los *Streptomyces* sobre el desarrollo de las cepas fúngicas (Fig 12).



**Fig 12:** Esquema BC para ensayar la actividad biológica de P

### **Ensayos de interacción BAL-HT/HP/*Streptomyces*.**

Las cepas de BAL, conservadas a -20°C, fueron repicadas a caldo MRS e incubadas a 30°C toda una noche. A partir de tales cultivos se sembraron estrías de 2 cm de longitud sobre placas de agar MRS que se incubaron 48h a 30°C en anaerobiosis. Dichas placas fueron luego cubiertas con una preparación de APD soft conteniendo  $10^5$  conidios/ml de cada uno de los HT/HP/*Streptomyces*. Las placas fueron luego incubadas aeróbicamente a 30°C por 5 días determinándose en ese momento el diámetro de la zona de inhibición (Z) alrededor de las estrías (Fig 12) (Magnusson y Schnurer, 2001).

### **Preparación de microsilos experimentales**

Preparación y selección del mejor carrier para inocular

Alicuotas de 20g de los sustratos (maíz y alfalfa) previamente molidos y esterilizados fueron inoculados con suspensiones de *Aspergillus* grupo *flavus* o de *Streptomyces* seleccionados de acuerdo a los ensayos de interacción *in vitro* en un volumen apropiado para alcanzar concentraciones de  $10^9$  conidios/g y de  $10^{10}$  conidios/g respectivamente. A las 0, 24 y 48h de incubación a 28°C se tomaron muestras de todos los tratamientos y se efectuó el recuento de UFC/g de sustrato empleando la técnica de diluciones sucesivas. Para el recuento de *Aspergillus* grupo *flavus* se utilizó AFPA como medio de cultivo y para los *Streptomyces*, APD. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

### **Confección de microsilos experimentales (ME)**

Se diseñó un experimento para evaluar el efecto producido por un HT y dos PBC, sobre ME de planta entera de maíz en todas las combinaciones posibles de los microorganismos.

Para el armado de los microsilos se utilizaron como contenedores bolsas plásticas bicapa de iguales características a las empleadas para la confección de los silos "a campo". Las bolsas plásticas fueron suministradas por los Ing. Agr. Casini y Santajuliana de la EEA-INTA Manfredi.

Para la confección de los ME se utilizó planta entera de maíz cosechada en estadio de grano lechoso. El maíz una vez picado fue mezclado y homogeneizado

con el/los “carriers” conteniendo el/los microorganismos adecuado/s para cada uno de los tratamientos. Se reprodujeron condiciones apropiadas (anaerobiosis) e inapropiadas (aerobiosis) de compactación y oxigenación. Para lograr buenas condiciones de compactación el llenado de las bolsas se realizó con apisonamiento del material y disminución del aire que pudiera haber quedado retenido. Para reproducir las malas condiciones los ME fueron llenados sin compactación y se procedió a realizar varios cortes de 10cm aproximadamente en cada bolsa.

## EVALUACIÓN QUÍMICA DE LOS FORRAJES

### Reactivos y soluciones utilizados

Los reactivos utilizados se presentan en la Tabla 10

**Tabla 10:** Composición de las soluciones empleados para la evaluación química de los forrajes.

<b>Soluciones utilizados</b>	<b>Composición</b>
Solución detergente neutra (SDN)	
(Broderick, 1994)	Lauril sulfato de sodio 30g E.D.T.A. 18,2g Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H anhidro 4,56g Borato de sodio.12H <sub>2</sub> O 6,81g Etilen glicol monoetil éter 10ml Agua destilada csp 1000ml pH final 6.9 - 7.0
Solución detergente ácida (SDA)	
(Broderick, 1994)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 27ml Cetrimida 20g SDN 200ml Agua destilada csp 1000ml
Solución indicadora de pH	
(Blain y Urtinette, 1954b)	Rojo de Metilo 0,1g Verde de Bromo Cresol 0,2g Alcohol al 95% csp 100ml
Mezcla catalizadora	
(Blain y Urtinette, 1954a)	Se 0,1g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5g

### Determinación de fibra detergente neutra (%FDN)

Para la determinación de %FDN se empleó la técnica de Broderick (1994). 0,5g de muestra seca y molida (malla de 1mm) fueron transferidos a vasos de Berzelius. Se adicionaron 50ml de SDN. Se conectaron los vasos al sistema de calentamiento por reflujo para hervir 5-10min y mantener la ebullición controlada durante 60min. Las suspensiones obtenidas fueron filtradas en sistema de filtrado múltiple. Los residuos fueron lavados 2 veces con 30 a 40ml de acetona, secados a 100°C 8hs y pesados ( $W_N$ ).

La fibra detergente neutra se expresó en porcentaje utilizando la siguiente fórmula:

$$\%FDN = \frac{(W_N) 100}{S}$$

$W_N$ : Peso residuo tratamiento neutro  
S: Peso seco de 0,5g de muestra

### Determinación de fibra detergente ácida (%FDA)

Para la determinación de %FDA se empleó la técnica de Broderick (1994). 0,5g de muestra seca y molida (malla de 1mm) fueron transferidos a vasos de Berzelius. Se adicionaron 50ml de SDA. Se conectaron los vasos al sistema de calentamiento por reflujo para hervir 5-10min y mantener la ebullición controlada durante 60min. Las suspensiones obtenidas fueron filtradas en sistema de filtrado múltiple. Los residuos fueron lavados 2 veces con H<sub>2</sub>O caliente y posteriormente con acetona, secados a 100°C 8hs y pesados ( $W_A$ ).

$$\%FDA = \frac{(W_A) 100}{S}$$

$W_A$ : Peso residuo tratamiento ácido  
S: Peso seco de 0,5g de muestra

### Determinación de nitrógeno total (%NT)

Fueron digeridos 0,1g de forraje con 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y 0,7ml de mezcla catalizadora en un balón de Kjeldahl (Blain y Urtinette, 1954a). El residuo fue disuelto en 10ml de H<sub>2</sub>O, adicionado con 5ml de solución de ácido bórico 2%P/V y 10ml de NaOH 40%P/V y destilado. El NH<sub>4</sub><sup>+</sup> recogido fue titulado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N empleando la solución indicadora.

$$\%NT = \frac{V \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ (ml)} \cdot N \text{ H}_2\text{SO}_4 \cdot 0.014 \cdot 100}{P}$$

P

V volumen del ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado en la titulaciónN: Normalidad del ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

P: Peso de la muestra (0,1g)

### Determinación de Proteína bruta (%PB)

Para convertir %NT a %PB se utilizó la fórmula de Blain y Urtinette (1954a).

$$\%PB = \%NT \cdot 6.25^*$$

\* Factor que puede cambiar de acuerdo al material analizado. Se basa en suponer que las proteínas verdaderas contienen 16% de N<sub>2</sub>

### Determinación de amoníaco (%NH<sub>3</sub>)

Fueron colocados 20g de muestra en un balón con 2g de MgO y 400ml de H<sub>2</sub>O (Blain y Urtinette, 1954a). La mezcla fue destilada durante 20min y el producto obtenido fue recogido en un recipiente conteniendo 20ml de ácido bórico 2%P/V y titulado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N.

$$\%NH_3 = \frac{V \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ (ml)} \cdot N \text{ H}_2\text{SO}_4 \cdot 0.017 \cdot 100}{P}$$

P

V volumen del ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado en la titulaciónN: Normalidad del ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

P: Peso de la muestra (20g)

### Determinación de nitrógeno insoluble en detergente ácido (%NIDA)

El residuo seco obtenido de %FDA fue sometido al método de Kjeldahl para determinar nitrógeno total.

$$\%NIDA = \frac{V \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ (ml)} \cdot N \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ (meq/ml)} \cdot F \text{ H}_2\text{SO}_4 \cdot 0,14 \cdot 100 \cdot 6,25}{\text{Peso muestra (g)}}$$

Peso muestra (g)

V volumen del ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado en la titulaciónN: Normalidad del ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>F: Formalidad del ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

P: Peso de la muestra (0,5g)

**Determinación del pH.**

A 50 g de muestra de silo fresco se le adicionó 50ml de H<sub>2</sub>O destilada. Luego de 1h se determinó el pH del sobrenadante con peachímetro (Blain y Urtinette; 1954b).

**Determinación de materia seca (%MS)**

Fueron colocados 200g de muestra en estufa de circulación de aire forzado a 60-65°C hasta pesada constante (P) (AOAC, 1990).

$$\%MS = \frac{P(g)}{200} \times 100$$

## *Resultados y Discusión*

## EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS FORRAJES

Los alimentos conservados constituyen un componente fundamental en la dieta de los rumiantes en muchas regiones del mundo. Para asegurar la calidad y la salud animal es necesario producir forrajes con alto valor nutritivo y calidad higiénica apropiada. Además de microorganismos indeseables como *Clostridium tyrobutyricum*, *C. botulinum*, *E. coli* O157 y *Listeria monocitogenes*, los hongos filamentosos y sus metabolitos secundarios causan una pobre “performance” del animal y desórdenes en la salud muy importantes (Thylín, 2000). La presencia de hongos en los forrajes está reconocida como una situación problemática ya que expone a los animales y al hombre a la inhalación y/o ingestión de sus propágulos y consecuentemente a diferentes patologías. Los géneros más importantes involucrados en la contaminación de productos del agro en detrimento del ganado que lo consume son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Hollinger y Ekperigin, 1999; Whitlow y Hagler, 2002).

Con el objeto de estudiar la contaminación de las reservas de alimentos destinadas para consumo del ganado productor de carne y leche se analizaron 147 muestras de alimentos (43 de maíz, 55 de sorgo y 49 de alfalfa), almacenados con diferentes técnicas de conservación, de la zona de influencia de la Estación Experimental INTA Rafaela del departamento Castellanos (EEAA Rafaela) de la Provincia de Santa Fe. Se recogieron entre 500 y 1500g de alimento a partir de distintos lugares del silo cubriéndolo en toda su extensión, finalizada la etapa de estabilización. En la Tabla 11 se muestra la distribución de las muestras teniendo en cuenta el tipo de matriz empleada y el sistema de conservación.

**Tabla 11:** Distribución de las muestras de forrajes teniendo en cuenta el tipo de matriz y el sistema de conservación

Forraje	Sistema de almacenamiento (Nº de muestras)					Total
	Bolsa planta entera	Bolsa grano húmedo	Puente	Henolaje	Rollo pastura	
Maíz	16	14	13	--	--	43
Sorgo	17	33	5	--	--	55
Alfalfa	22	--	1	22	4	49
<b>Total</b>	55	47	19	22	4	<b>147</b>

Para evaluar el grado de contaminación de las muestras se estudiaron los siguientes parámetros:

Parámetros químico-fermentativos

- pH
- % NH<sub>3</sub>/NT

La determinación de los valores de estos parámetros fue realizada en el Laboratorio de Producción Animal de la EE AA INTA Rafaela .

Parámetros Micológicos

- Recuento e identificación de las cepas fúngicas aisladas.
- Determinación de la presencia de *Aspergillus fumigatus* como patógeno del hombre y de animales.

Parámetros Toxicológicos

- Determinación de aflatoxinas totales (AF)
- Determinación de deoxinivalenol (DON)

**Evaluación de los parámetros químico-fermentativos**

La evaluación químico-fermentativa brindó una estimación de la calidad del forraje. La medición del pH valora la calidad de fermentación y conservación, mientras que la relación %NH<sub>3</sub>/NT es usada como indicador de su degradación proteica o valor nutricional (Driehius y col., 2000).

Los valores de pH y % NH<sub>3</sub>/NT se presentan en la Tabla 12 (a, b y c) para los forrajes base maíz, sorgo y alfalfa respectivamente.

Como se mencionó anteriormente la evaluación químico-fermentativa ha sido definida por la American Society of Agronomy, (1994) como:

- Muy Buena (pH ≤ 4 y % NH<sub>3</sub>/NT ≤ 5).
- Buena (pH ≤ 4 y % NH<sub>3</sub>/NT entre 5 y 15)
- Regular (pH > 4 y % NH<sub>3</sub>/NT ≤ 15).
- Mala (pH > 4 y % NH<sub>3</sub>/NT >15)

**Tabla 12a:** Parámetros químico-fermentativos en muestras de forrajes de maíz

<b>MAÍZ</b>				
Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros químico- fermentativos		Evaluación qco-ferm (2)
		pH	%NH3/NT	
1	B-P	4.10	5.54	R
2	B-P	3.80	7.31	R
3	B-P	4.20	6.93	R
4	B-P	4.10	8.71	R
5	B-P	4.70	15.03	M
6	B-G	4.70	5.37	R
7	B-G	4.90	14.41	R
8	Bu-P	3.60	5.31	B
9	Bu-P	3.60	6.93	B
10	B-P	4.10	12.50	R
11	B-P	4.20	11.50	R
12	B-P	4.50	13.00	R
13	B-P	4.20	8.50	R
14	B-P	4.00	13.00	R
15	B-P	5.10	15.50	M
16	B-P	3.70	10.60	R
17	B-P	3.60	11.40	B
18	B-P	4.00	12.30	B
19	B-P	4.10	11.50	R
20	B-P	4.20	10.30	R
21	B-G	4.90	15.60	M
22	B-G	4.30	11.80	R
23	B-G	4.60	12.80	R
24	B-G	4.80	13.30	R
25	B-G	4.50	14.20	R
26	B-G	4.10	12.60	R
27	B-G	4.80	15.70	M
28	B-G	4.90	13.30	R
29	B-G	4.10	10.50	R
30	B-G	4.00	12.30	B
31	B-G	4.60	11.80	R
32	B-G	3.80	10.80	R
33	Bu-P	4.20	15.80	M
34	Bu-P	3.90	13.80	R

**Tabla 12a** (cont): Parámetros-químico fermentativos en muestras de forrajes de maíz

Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros químico- fermentativos		Evaluación qco-ferm (2)
		pH	%NH3/NT	
35	Bu-P	3.60	9.80	B
36	Bu-P	3.70	9.20	B
37	Bu-P	4.10	11.50	R
38	Bu-P	4.30	10.50	R
39	Bu-P	4.10	10.50	R
40	Bu-P	3.80	9.80	B
41	Bu-P	4.60	13.20	R
42	Bu-P	4.10	10.90	R
43	Bu-P	3.90	12.30	B
<b>% Muestras riesgosas</b>				<b>11,63</b>

## (1) Sistemas de almacenamiento:

- Ro Rollo      H Henolaje
- B-P Planta entera almacenada en silo bolsa
- Bu-P Planta entera almacenada en silo puente (bunker)
- B-G Grano húmedo almacenado en silo bolsa

## (2) Evaluación químico - fermentativa (American Society of Agronomy, 1994):

- MB Muy Buena
- B Buena
- R Regular
- M Mala

Tabla 12b: Parámetros químico-fermentativos en muestras de forrajes de sorgo

SORGO				
Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros químico-fermentativos		Evaluación qco-ferm (2)
		pH	%NH3/NT	
1	B-P	3.87	4.46	MB
2	B-G	4.19	12.18	R
3	B-G	4.56	3.04	R
4	B-G	4.40	10.65	R
5	B-G	4.48	20.90	M
6	B-G	4.12	5.65	R
7	B-G	4.92	5.75	R
8	B-G	5.13	1.69	R
9	B-G	6.13	0.07	R
10	B-G	6.10	0.06	R
11	B-G	5.06	4.17	R
12	B-G	4.20	7.67	R
13	B-G	4.10	7.07	R
14	B-G	4.62	2.92	R
15	B-G	4.12	11.78	R
16	B-P	4.90	13.23	R
17	B-G	4.08	12.90	R
18	B-P	4.05	9.23	R
19	B-P	3.92	6.42	B
20	B-G	3.88	12.32	R
21	B-G	3.77	5.97	B
22	B-G	4.50	9.69	R
23	B-G	4.35	13.44	R
24	B-G	4.09	10.20	R
25	B-G	5.37	13.08	R
26	B-P	4.08	8.78	R
27	B-P	3.97	10.24	B
28	B-P	3.96	13.54	B
29	B-P	3.85	4.00	MB
30	B-G	5.91	2.29	R
31	B-G	6.21	14.23	R
32	B-G	6.10	0.57	R

**Tabla 12b** (cont): Parámetros químico-fermentativos en muestras de forrajes de sorgo

Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros químico-fermentativos		Evaluación qco-ferm (2)
		pH	%NH3/NT	
33	B-G	4.75	5.12	R
34	B-P	3.93	11.20	B
35	B-G	8.75	3.14	R
36	B-P	3.85	5.00	MB
37	B-P	3.89	4.60	MB
38	B-P	7.01	5.30	R
39	B-G	4.61	10.57	R
40	B-P	5.35	3.75	R
41	B-P	3.78	11.87	B
42	B-G	7.26	1.12	R
43	Bu-P	4.57	17.57	M
44	B-P	4.04	8.80	R
45	Bu-P	5.10	17.31	M
46	Bu-P	5.30	20.14	M
47	B-G	5.50	10.31	R
48	B-G	5.30	9.05	R
49	Bu-P	5.90	17.41	M
50	Bu-P	4.00	6.31	B
51	B-P	3.90	6.93	B
52	B-P	4.10	10.01	R
53	B-G	5.60	11.93	R
54	B-G	4.70	8.93	R
55	B-G	4.60	7.93	R
<b>%Muestras riesgosas</b>				<b>9.09</b>

(1) Sistemas de almacenamiento:

Ro Rollo

H Henolaje

B-P Planta entera almacenada en silo bolsa

Bu-P Planta entera almacenada en silo puente (bunker)

B-G Grano húmedo almacenado en silo bolsa

(2) Evaluación químico - fermentativa (American Society of Agronomy, 1994):

MB Muy Buena

B Buena

R Regular

M Mala

Tabla 12c: Parámetros químico-fermentativos en muestras de forrajes de alfalfa

ALFALFA				
Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros químico-fermentativos		Evaluación qco-ferm (2)
		pH	%NH3/NT	
1	Ro	4.8	16.07	M
2	Ro	5.3	18.1	M
3	B-P	5.3	10.31	R
4	B-P	6.3	17.43	M
5	Bu-P	4.4	10.41	R
6	B-P	5.2	9.83	R
7	Ro	3.8	7.88	B
8	Ro	6.3	16.23	M
9	H	3.5	4.32	MB
10	H	3.6	9.45	B
11	B-P	4.81	11.08	R
12	B-P	4.8	15.36	M
13	B-P	5.83	21.73	M
14	B-P	4.76	24.77	M
15	B-P	5.39	30	M
16	B-P	5.18	16.82	M
17	B-P	4.36	13.33	R
18	B-P	4.86	22.96	M
19	B-P	8.67	55.91	M
20	B-P	6.36	10.77	R
21	B-P	4.71	16.62	M
22	B-P	4.7	10.48	R
23	B-P	4.65	16.2	M
24	B-P	4.94	24.23	M
25	B-P	5.27	26.46	M
26	B-P	4.62	12.5	R
27	B-P	4.36	9.41	R
28	B-P	4.98	19.05	M
29	B-P	5.37	23.72	M
30	H	5.85	37.69	M
31	H	7.23	14.66	R
32	H	5.12	13.17	R

**Tabla 12c** (cont): Parámetros químico-fermentativos en muestras de forrajes de alfalfa

Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros químico- fermentativos		Evaluación qco-ferm (2)
		pH	%NH3/NT	
33	H	8.44	21	R
34	H	8.62	14.35	R
35	H	9.24	7.77	R
36	H	6.14	15.37	M
37	H	6.13	15.01	M
38	H	7.60	16.21	M
39	H	7.27	15.11	M
40	H	6.87	17.13	M
41	H	6.94	15.93	M
42	H	4.89	10.66	R
43	H	8.92	14.48	R
44	H	5.38	9.71	R
45	H	6.03	15.38	M
46	H	5.13	13.54	R
47	H	5.21	13.64	R
48	H	5.43	10.93	R
49	H	8.29	16.62	M
<b>%Muestras riesgosas</b>				<b>55,11</b>

(1) Sistemas de almacenamiento:

H Henolaje

B-P Planta entera almacenada en silo bolsa

Bu-P Planta entera almacenada en silo puente (bunker)

B-G Grano húmedo almacenado en silo bolsa

(2) Evaluación químico - fermentativa (American Society of Agronomy, 1994):

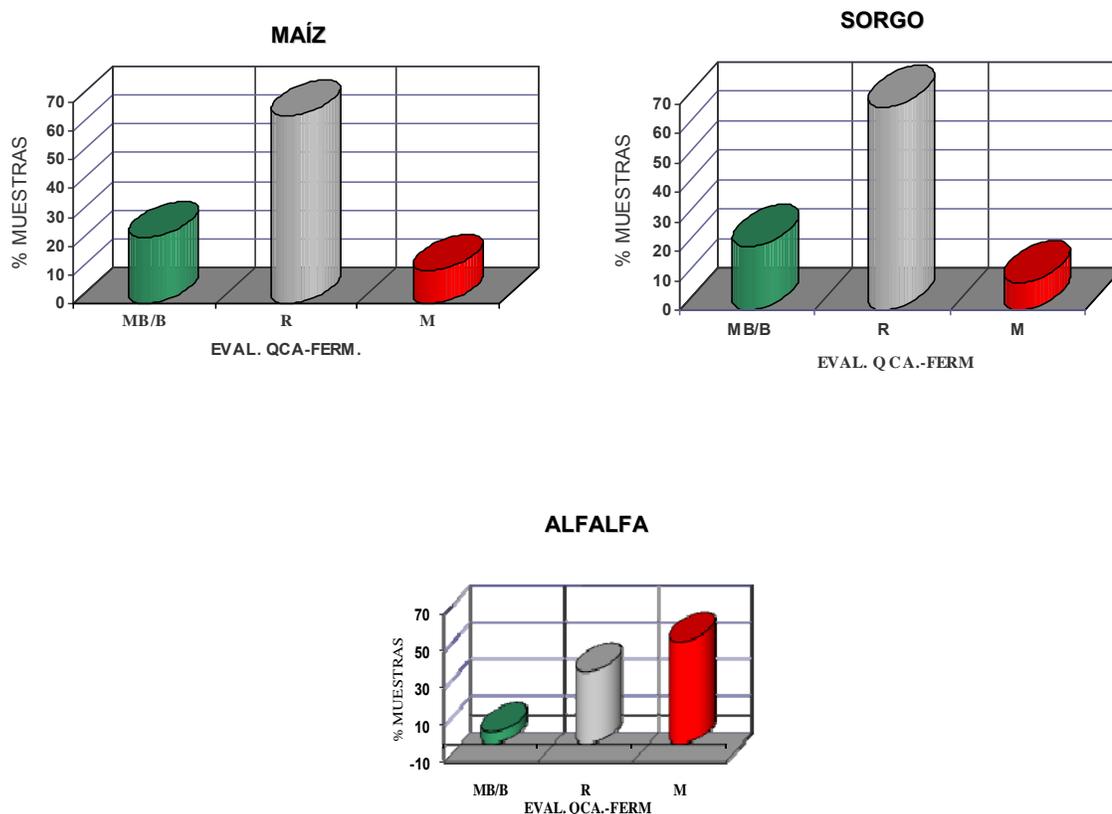
MB Muy Buena

B Buena

R Regular

M Mala

La clasificación de las muestras de acuerdo a los parámetros químico-fermentativos presentados en la Tabla 12 (a, b y c) se analizan en la Fig. 13. De las 147 muestras estudiadas sólo resultaron de calidad muy buena o buena el 23.23%, 21.82% y 6.12% para maíz, sorgo y alfalfa respectivamente. De las muestras de alfalfa, el mayor porcentaje (55.1%) presentó calidad mala y riesgosa para la salud animal; mientras que el 38.8% de ellas resultaron de calidad regular y por lo tanto indefinida para el consumo. Los forrajes de maíz y sorgo presentaron la mayor proporción (65.1% y 69.1%) de muestras con calidad regular de acuerdo a las características químico-fermentativas evaluadas. Los altos porcentajes de muestras de calidad indefinida ponen en evidencia la necesidad de buscar nuevos parámetros que permitan evaluar en forma rápida, económica y sencilla la calidad del alimento destinado al consumo animal.



**Fig. 13:** Evaluación químico-fermentativa de las muestras de forrajes base maíz, sorgo y alfalfa distribuidas como **MB/B** Muy Buenas / Buenas, **R** Regulares o **M** Malas.

### **Relación entre el sistema de conservación y la calidad químico-fermentativa de los forrajes.**

El 59% de las muestras de planta entera de sorgo almacenadas en bolsa resultaron de calidad buena o muy buena y el 41% restante, de calidad regular (Tabla 12b). El 94% de las muestras de grano húmedo almacenadas en bolsas fueron de calidad regular, registrándose un 3% de muestras malas y un 3% de muestras buenas o muy buenas. El 80% de muestras de planta entera almacenadas como silo puente fueron de mala calidad y el 20% restante de calidad buena.

El 83% de las muestras de sorgo categorizadas como buenas o muy buenas fueron almacenadas en bolsas (grano húmedo y planta entera). El 94,3% de las de calidad químico-fermentativa regular fueron almacenadas en bolsas como grano húmedo (61%) o como planta entera (31%). El 8,0% de las muestras calificadas como malas fueron conservadas en silos puente.

De acuerdo al test exacto de Fischer (Stokes y col., 2000) se pudo determinar que existe una correlación estadística ( $p < 0.00001$ ) entre la evaluación químico-fermentativa de los forrajes de sorgo y la metodología de almacenamiento, no recomendándose el sistema puente para este tipo de sustrato. (Amigot y col., 2001a; Amigot y col., 2005a; Amigot y col., 2006).

El 55% de las muestras de alfalfa resultaron de calidad químico-fermentativa mala y el 39% de calidad regular, independientemente del sistema de conservación empleado. Después de aplicado el test de Fischer ( $p = 0.12$ ) se concluyó que no existe asociación significativa entre el sistema de almacenado y la calidad químico-fermentativa para esta matriz (Amigot y col., 2001a; Amigot y col., 2003; Amigot y col., 2005a; Amigot y col., 2006).

La mayor parte de las muestras de maíz estudiadas (65%) resultaron de calidad regular mientras que el 23% de ellas fueron de calidad buena o muy buena y el 12% restante de calidad mala. Aplicando el test de Fischer se concluyó que en este caso tampoco existe asociación significativa ( $p = 0.21$ ) entre la calidad químico-fermentativa y el sistema de almacenamiento aplicado (Amigot y col., 2001a; Amigot y col., 2003; Amigot y col., 2005a; Amigot y col., 2006).

En síntesis:

El sistema de conservación no se correlacionó significativamente con la aceptabilidad química cuando maíz o alfalfa fueron usados como matriz de los forrajes. Cuando se utilizó sorgo como sustrato se encontró una asociación significativa entre el sistema puente de conservación y la mala calidad del alimento.

El alto porcentaje de muestras de forraje de calidad químico-fermentativa regular mostró la necesidad de analizar otros parámetros que permitan tomar una decisión con respecto a la aceptabilidad de un forraje para su uso en la alimentación animal.

### ***Evaluación de los parámetros microbiológicos***

#### **Recuento e identificación de la flora fúngica.**

Para estudiar el grado de contaminación fúngica presente en los alimentos se utilizó el procedimiento de Pitt y Hocking (1999). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13 (a, b y c) para las muestras de maíz, sorgo y alfalfa respectivamente. Se consideraron inapropiados para la alimentación animal aquellas muestras de forrajes con:

- Recuentos  $\geq 10^6$  UFC fúngicas/g de alimento y/o
- Presencia de *Aspergillus fumigatus*., importante patógeno de hombres y animales

Tabla 13a: Evaluación tóxico-micológica de muestras de ensilados de maíz

MAÍZ						
Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros tóxico - micológicos				Evaluación toxico-micol (4)
		Recuento UFC/g (2)	<i>A. fumigatus</i>	AF µg/kg (3)	DON µg/kg (3)	
1	B-P	---	---	0	0	A
2	B-P	---	---	0	0	A
3	B-P	---	---	0	0	A
4	B-P	---	---	0	0	A
5	B-P	---	---	0	500	Ri
6	B-G	---	---	0	0	A
7	B-G	1 x 10 <sup>6</sup>	+	0	2000	Ri
8	Bu-P	---	---	0	0	A
9	Bu-P	---	---	2	0	A
10	B-P	3 x 10 <sup>4</sup>	---	1.0	100	Ri
11	B-P	3 x 10 <sup>2</sup>	---	1.8	100	Ri
12	B-P	1 x 10 <sup>5</sup>	---	1.1	200	Ri
13	B-P	5 x 10 <sup>2</sup>	---	0	100	A
14	B-P	1 x 10 <sup>4</sup>	---	13.8	0	Ri
15	B-P	1.2 x 10 <sup>7</sup>	---	9.6	0	Ri
16	B-P	1 x 10 <sup>4</sup>	---	4.5	0	Ri
17	B-P	1 x 10 <sup>2</sup>	---	2	100	Ri
18	B-P	---	---	2.8	100	Ri
19	B-P	6 x 10 <sup>2</sup>	---	11	100	Ri
20	B-P	---	---	3.2	500	Ri
21	B-G	8.1 x 10 <sup>7</sup>	---	2.1	0	Ri
22	B-G	4.2 x 10 <sup>5</sup>	---	1.4	100	Ri
23	B-G	1 x 10 <sup>6</sup>	---	1	300	Ri
24	B-G	3 x 10 <sup>6</sup>	---	0	400	Ri
25	B-G	4.2 x 10 <sup>7</sup>	---	2.6	100	Ri
26	B-G	3.4 x 10 <sup>7</sup>	---	5.9	0	Ri
27	B-G	1 x 10 <sup>8</sup>	---	5.9	0	Ri
28	B-G	2.4 x 10 <sup>8</sup>	---	1.0	0	Ri
29	B-G	3 x 10 <sup>4</sup>	+	0	800	Ri
30	B-G	1.2 x 10 <sup>7</sup>	---	0	600	Ri
31	B-G	4.4 x 10 <sup>6</sup>	---	0	0	Ri
32	B-G	3 X 10 <sup>2</sup>	---	8.4	200	Ri

Tabla 13a (cont): Evaluación tóxico-micológica de muestras de ensilados de maíz

Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros tóxico – micológicos				Evaluación toxico-micol (4)
		Recuento UFC/g (2)	<i>A. fumigatus</i>	AF µg/kg (3)	DON µg/kg (3)	
33	Bu-P	2x 10 <sup>3</sup>	---	0	100	A
34	Bu-P	1 x 10 <sup>4</sup>	---	5.4	100	Ri
35	Bu-P	1 x 10 <sup>2</sup>	---	2.3	0	A
36	Bu-P	---	---	0	100	A
37	Bu-P	3 x 10 <sup>4</sup>	---	1.3	200	Ri
38	Bu-P	1 x 10 <sup>4</sup>	---	1.8	300	Ri
39	Bu-P	3 x 10 <sup>3</sup>	---	6.3	100	Ri
40	Bu-P	---	---	2.3	0	A
41	Bu-P	2 x 10 <sup>7</sup>	---	3.7	0	Ri
42	Bu-P	1.2 x 10 <sup>5</sup>	---	4.7	0	Ri
43	Bu-P	3 x 10 <sup>6</sup>	---	6.9	0	Ri
<b>% Muestras Riesgosas (Ri)</b>		<b>27.9</b>	<b>4,6</b>	<b>30.2</b>	<b>13.9</b>	<b>72.1</b>
				<b>23.3 (5)</b>		

(1) Sistema de almacenamiento

Ro Rollo

H Henolaje

B-P Planta entera almacenada en silo bolsa

Bu-P Planta entera almacenada en silo puente (bunker)

B-G Grano húmedo almacenado en silo bolsa

(2) ---Rto < 10UFC/g

(3) 0 No detectable

(4) Evaluación del forraje basada en los parámetros tóxico-micológicos

A Aceptable

Ri Riesgosa (presencia de *A. fumigatus* y/o Recuentos  $\geq 10^6$  UFC fúngicas/g y/o AF  $\geq 3\mu\text{g/Kg}$  y/o DON  $\geq 400\mu\text{g/Kg}$  y/o AF <  $3\mu\text{g/Kg}$  y DON <  $400\mu\text{g/Kg}$ )

(5) % de muestras con AF <  $3\mu\text{g/Kg}$  y DON <  $400\mu\text{g/Kg}$ , pero simultáneamente

Tabla 13b: Evaluación tóxico-micológica de muestras de ensilados de sorgo

SORGO						
Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros tóxico - micológicos				Evaluación toxico-micol (4)
		Recuento UFC/g (2)	<i>A. fumigatus</i>	AF µg/kg (3)	DON µg/kg (3)	
1	B-P	2 x 10 <sup>3</sup>	---	0	0	A
2	B-G	2.4 x 10 <sup>3</sup>	---	0	0	A
3	B-G	---	---	0	0	A
4	B-G	---	---	1	0	A
5	B-G	---	---	0	0	A
6	B-G	2 x 10 <sup>2</sup>	---	0	0	A
7	B-G	3.7 x 10 <sup>4</sup>	+	0	0	Ri
8	B-G	2.7 x 10 <sup>7</sup>	---	6	0	Ri
9	B-G	6 x 10 <sup>6</sup>	---	8	0	Ri
10	B-G	7 x 10 <sup>7</sup>	---	80	0	Ri
11	B-G	5 x 10 <sup>7</sup>	---	0	0	Ri
12	B-G	1 x 10 <sup>2</sup>	---	2	0	A
13	B-G	---	---	3	0	Ri
14	B-G	1 x 10 <sup>2</sup>	---	20	0	Ri
15	B-G	---	---	0	0	A
16	B-P	2 x 10 <sup>3</sup>	---	0	0	A
17	B-G	2 x 10 <sup>2</sup>	---	0	0	A
18	B-P	2 x 10 <sup>4</sup>	---	0	0	A
19	B-P	1 x 10 <sup>3</sup>	---	0	0	A
20	B-G	1 x 10 <sup>3</sup>	---	2	0	A
21	B-G	1 x 10 <sup>2</sup>	---	0	0	A
22	B-G	4 x 10 <sup>2</sup>	---	0	0	A
23	B-G	2 x 10 <sup>2</sup>	---	0	0	A
24	B-G	40	---	0	0	A
25	B-G	50	---	0	0	A
26	B-P	---	---	0	0	A
27	B-P	1 x 10 <sup>2</sup>	---	0	0	A
28	B-P	1 x 10 <sup>3</sup>	---	0	0	A
29	B-P	---	---	0	0	A
30	B-G	8 x 10 <sup>7</sup>	---	0	0	Ri
31	B-G	6 x 10 <sup>4</sup>	+	10	100	Ri

Tabla 13b (cont): Evaluación tóxico-micológica de muestras de ensilados de sorgo

Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros tóxico - micológicos				Evaluación toxico-micol (4)
		Recuento UFC/g (2)	<i>A. fumigatus</i>	AF $\mu\text{g/kg}$ (3)	DON $\mu\text{g/kg}$ (3)	
32	B-G	$6 \times 10^6$	---	9	500	Ri
33	B-G	$2 \times 10^3$	---	0	0	A
34	B-P	---	---	0	0	A
35	B-G	$4 \times 10^7$	+	4	0	Ri
36	B-P	$5 \times 10^3$	---	0	0	A
37	B-P	---	---	0	0	A
38	B-P	$4 \times 10^4$	+	5	0	Ri
39	B-G	$1 \times 10^2$	---	0	0	A
40	B-P	$2 \times 10^7$	+	5	0	Ri
41	B-P	$1 \times 10^2$	---	0	0	A
42	B-G	$1 \times 10^7$	+	0	0	Ri
43	Bu-P	$1 \times 10^4$	---	0	0	A
44	B-P	$1 \times 10^4$	---	11	0	A
45	Bu-P	---	---	0	0	A
46	Bu-P	---	---	0	500	Ri
47	B-G	$1 \times 10^6$	---	0	500	Ri
48	B-G	---	---	0	0	A
49	Bu-P	$1 \times 10^2$	+	0	0	Ri
50	Bu-P	---	---	0	0	A
51	B-P	---	---	0	0	A
52	B-P	$1 \times 10^6$	---	0	0	Ri
53	B-G	$3 \times 10^3$	+	0	0	Ri
54	B-G	---	---	0	0	A
55	B-G	---	---	0	0	A
<b>%Muestras Riesgosas (Ri)</b>		<b>20.0</b>	<b>14.55</b>	<b>20.0</b>	<b>5.5</b>	<b>34.5</b>
				<b>3.6(5)</b>		

(1) Sistema de almacenamiento

Ro Rollo

H Henolaje

H Henolaje

B-P Planta entera almacenada en silo bolsa

Bu-P Planta entera almacenada en silo puente (bunker)

B-G Grano húmedo almacenado en silo bolsa

(2) ---Rto &lt; 10UFC/g (3) 0 No detectables

(4) Evaluación del forraje basada en los parámetros tóxico-micológicos

A Aceptable

Ri Riesgosa (presencia de *A. fumigatus* y/o Recuentos  $\geq 10^6$  UFC fúngicas/g y/o AF  $\geq 3\mu\text{g/Kg}$  y/o DON  $\geq 400\mu\text{g/Kg}$  y/o AF <  $3\mu\text{g/Kg}$  y DON <  $400\mu\text{g/Kg}$ )(5) % de muestras con AF <  $3\mu\text{g/Kg}$  y DON <  $400\mu\text{g/Kg}$ , pero simultáneamente

Tabla 13c: Evaluación tóxico-micológica de muestras de ensilados de alfalfa

ALFALFA							
Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros tóxico - micológicos				Evaluación toxico-micol (4)	
		Recuento UFC/g (2)	<i>A. fumigatus</i>	AF $\mu$ /kg (3)	DON $\mu$ g/kg (3)		
1	Ro	$6 \times 10^2$	---	0	1000	Ri	
2	Ro	$1.5 \times 10^3$	---	0	2000	Ri	
3	B-P	---	---	0	0	A	
4	B-P	$1 \times 10^2$	---	0	0	A	
5	Bu-P	---	---	0	0	A	
6	B-P	---	---	0	0	A	
7	Ro	---	---	0	0	A	
8	Ro	---	---	0	2000	Ri	
9	H	---	---	0	0	A	
10	H	---	---	0	0	A	
11	B-P	---	---	9.8	400	Ri	
12	B-P	---	---	3	0	Ri	
13	B-P	---	---	2.6	0	A	
14	B-P	---	---	2.4	100	Ri	
15	B-P	---	---	5.5	0	Ri	
16	B-P	---	---	2.3	0	Ri	
17	B-P	---	---	3.5	0	Ri	
18	B-P	---	---	5.9	0	Ri	
19	B-P	$5 \times 10^2$	---	3.7	0	Ri	
20	B-P	---	---	3.5	0	Ri	
21	B-P	---	---	5.2	100	Ri	
22	B-P	$4 \times 10^2$	---	6.2	100	Ri	
23	B-P	$3.8 \times 10^3$	---	4	100	Ri	
24	B-P	---	---	7.9	200	Ri	
25	B-P	$4 \times 10^4$	---	6.5	0	Ri	
26	B-P	---	---	7.1	100	Ri	
27	B-P	$6 \times 10^2$	---	4	200	Ri	
28	B-P	$1 \times 10^2$	---	8.2	300	Ri	
29	B-P	---	---	7.7	0	Ri	
30	H	$2.3 \times 10^5$	---	0	0	A	
31	H	$7.5 \times 10^4$	---	0	0	A	
32	H	---	---	0	0	A	
33	H	$2 \times 10^2$	---	0	0	A	
34	H	$2.6 \times 10^7$	---	0	0	Ri	

Tabla 13c (cont): Evaluación tóxico-micológica de muestras de ensilados de alfalfa

Muestras	Sistema de almacenamiento (1)	Parámetros tóxico - micológicos				Evaluación Toxico-micol (4)
		Recuento UFC/g (2)	<i>A.fumigatus</i>	AF $\mu\text{g}/\text{kg}$ (3)	DON $\mu\text{g}/\text{kg}$ (3)	
35	H	1.8x10 <sup>6</sup>	---	0	100	Ri
36	H	2 x 10 <sup>6</sup>	---	1.4	0	Ri
37	H	4 x 10 <sup>2</sup>	---	2.5	0	A
38	H	2 x 10 <sup>5</sup>	---	2.6	200	Ri
39	H	3 x 10 <sup>6</sup>	---	2.9	100	Ri
40	H	2 x 10 <sup>6</sup>	---	3.4	300	Ri
41	H	2 x 10 <sup>6</sup>	---	1.5	400	Ri
42	H	1 x 10 <sup>5</sup>	---	8.5	300	Ri
43	H	7 x 10 <sup>5</sup>	---	5.5	400	Ri
44	H	2 x 10 <sup>6</sup>	---	11	0	Ri
45	H	3 x 10 <sup>3</sup>	---	11.8	200	Ri
46	H	1 x 10 <sup>7</sup>	---	10	100	Ri
47	H	1 x 10 <sup>7</sup>	---	10.1	100	Ri
48	H	6 x 10 <sup>6</sup>	---	5.5	100	Ri
49	H	6 x 10 <sup>2</sup>	---	8.1	300	Ri
<b>% Muestras Riesgosas (Ri)</b>		<b>20.5</b>	<b>0.00</b>	<b>51.0</b>	<b>12,2</b>	<b>71.4</b>
				<b>6.1 (5)</b>		

(5) Sistema de almacenamiento

Ro Rollo

H Henolaje

B-P Planta entera almacenada en silo bolsa

Bu-P Planta entera almacenada en silo puente (bunker)

B-G Grano húmedo almacenado en silo bolsa

(6) ---Rto &lt; 10UFC/g

(7) 0 No detectable

(8) Evaluación del forraje basada en los parámetros tóxico-micológicos

A Aceptable

Ri Riesgosa (presencia de *A. fumigatus* y/o Recuentos  $\geq 10^6$  UFC fúngicas/g y/o AF  $\geq 3\mu\text{g}/\text{Kg}$  y/o DON  $\geq 400\mu\text{g}/\text{Kg}$  y/o AF <  $3\mu\text{g}/\text{Kg}$  y DON <  $400\mu\text{g}/\text{Kg}$ )(5) % de muestras con AF <  $3\mu\text{g}/\text{Kg}$  y DON <  $400\mu\text{g}/\text{Kg}$ , pero simultáneamente

Los forrajes de alfalfa y sorgo presentaron un menor nivel de contaminación (20,5% y 20%, respectivamente) debido tal vez a una menor disponibilidad de azúcares (Feutch y Treutter, 1999) fermentecibles en el primero y una mayor concentración de taninos en el segundo

La identificación de las cepas fúngicas aisladas se realizó con el objeto de determinar la presencia de hongos patógenos para la salud humana y animal y hongos potencialmente productores de micotoxinas (*Aspergillus* Website, 2007). El número de aislamientos y la distribución de los hongos en relación al tipo de sustrato se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14:** Micoflora aislada de forrajes conservados para consumo animal

HONGOS	Nº aislamientos		
	MAÍZ	SORGO	ALFALFA
<i>Absidia corymbifera</i>	4	5	
<i>Alternaria alternata</i>		5	1
<i>Alternaria infectoria</i>		1	
<i>Aspergillus candidus</i> *	2	1	
<i>Aspergillus clavatus</i> *	1	1	2
<i>Aspergillus flavus</i> *	3	4	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> *	2	8	
<i>Aspergillus niger</i> *	2		1
<i>Aspergillus parasiticus</i> *	1		
<i>Aspergillus terreus</i> *	2	1	1
<i>Aspergillus wentii</i> *	2		
<i>Byssochlamys nivea</i>	3	8	2
<i>Chaetomium globosum</i>	1		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	3	1
<i>Cladosporium</i> sp.	3	1	1
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1		1
<i>Endomyces fibuliger</i>	2	4	3
<i>Endomyces</i> sp.	1		
<i>Epicoccun nigrum</i>	1	3	
<i>Eurotiom amstelodami</i> *	2		
<i>Eurotium chevalieri</i> *	3		
<i>Eurotium repens</i>	1		
<i>Fusarium equiseti</i> *			1
<i>Fusarium oxysporum</i> *			1
<i>Fusarium proliferatum</i> *		2	2
<i>Fusarium semitectum</i> *			1
<i>Fusarium solani</i> *		3	2

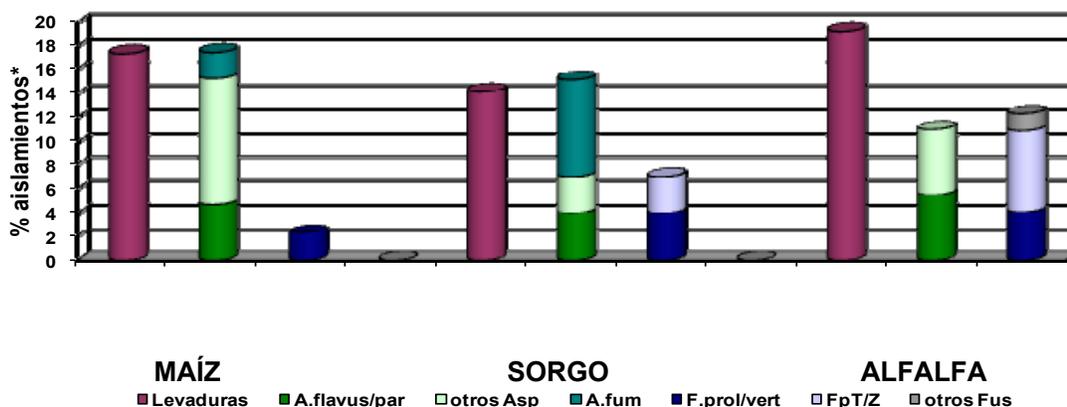
**Tabla 14**(cont): Micoflora aislada de forrajes conservados para consumo animal

HONGOS	N° aislamientos		
	MAÍZ	SORGO	ALFALFA
<i>Fusarium</i> sp.			1
<i>Fusarium verticillioides</i> *	2	2	1
<i>Geotrichum candidum</i>	2	6	1
<i>Gliomastix murorum</i>			2
<i>Gliomastix</i> sp.		1	1
<i>Hyphopichia burtonii</i>	5	4	5
Levaduras	15	14	14
<i>Monascus ruber</i>		3	3
<i>Moniliella acetobutans</i>		6	1
<i>Mucor circinelloides</i>	4	3	3
<i>Mucor hiemalis</i>	5	2	
<i>Mucor racemosus</i>		1	
<i>Neosartorya fischeri</i> *	1	3	5
<i>Paecilomyces variotii</i>		1	
<i>Penicillium brevicompactum</i>			1
<i>Penicillium crustosum</i>	1	1	
<i>Penicillium minioluteum</i>	1		
<i>Penicillium solitum</i>	1		
<i>Penicillium</i> sp.	2		
<i>Penicillium viridicatum</i> *	1		
<i>Phoma</i> sp.	1		1
<i>Rhizopus microsporus</i>		1	
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1		7
<i>Talaromyces flavus</i>	1		
<i>Talaromyces</i> sp.		1	
<i>Trichoderma harzianum</i>		2	
<i>Verticillium</i> sp.	3		
Zygomycetes (otros)	1	1	3
<b>N° Total de aislamientos</b>	<b>86</b>	<b>99</b>	<b>73</b>

\*especies potencialmente toxigénicas

La micoflora aislada se distribuyó en 26 géneros y 46 especies. Los hongos levaduriformes fueron los de mayor aparición en todos los forrajes: 17.4%, 14.1% y 19.2% de todos los aislamientos para maíz, sorgo y alfalfa, respectivamente (Amigot y col., 2002). Con la presencia de O<sub>2</sub> en el silo los hongos levaduriformes incrementan su actividad y consumen el ácido láctico contribuyendo al deterioro aeróbico (Oude Elferink y col., 1999a; Oude Elferink y col., 1999b, Seglar, 2003; Hagler y Whitlow; 2007). Entre los hongos filamentosos se observó un predominio de

especies potencialmente toxigénicas, aproximadamente el 33% del total de aislamientos. El género *Aspergillus* fue el mayoritariamente aislado de los 3 sustratos (17.4%, 15.2% y 10.9%) en maíz, sorgo y alfalfa respectivamente, seguido por *Penicillium* (8.1%) en maíz, por *Fusarium* (10.9%) en alfalfa, y por *Byssochlamys* (8.1%) y *Fusarium* (7.1%) en sorgo (Amigot y col., 2001b; Amigot y col., 2005a; Amigot y col., 2006) (Fig 14), coincidiendo con lo expresado por Auerbach (2003) que ha informado que la flora fúngica presente en un ensilado varía con el tipo de matriz. En todos los sustratos las especies de *Aspergillus* sección *flavi* fueron los aislados de mayor frecuencia, indicando además una contaminación precosecha. Estos resultados están de acuerdo con lo hallado por Gonzalez Pereyra (2008) en silos de maíz. El daño que estos hongos pueden producir en los alimentos por su presencia, se ve incrementado por la posibilidad de la producción de niveles inaceptables de micotoxinas (Pitt y Hocking, 1999).



\* porcentaje de aislamientos de cada grupo de hongos en relación al total de cepas aisladas en cada matriz

**Fig 14** Densidad relativa\* de aislamientos de levaduras, *Aspergillus* y *Fusarium* en muestras de forrajes.

Géneros como *Fusarium*, *Cladosporium* o *Alternaria*, considerados como hongos de campo, pueden indicar malas condiciones de preservación (Buckle, 1983; Scudamore y Livesey, 1998).

Garon y col (2006) realizaron en Francia un monitoreo de la contaminación con hongos toxigénicos en silos de maíz y en un período de 9 meses encontraron que las principales especies toxicogénicas asociadas con el ensilaje eran: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Por otra parte, otras especies aisladas frecuentemente como contaminantes naturales correspondieron a *B. nivea*, *P. roqueforti*, *Monascus* spp. y *Trichoderma* spp. (Garon y col., 2006).

En el año 2007 en Francia, fue realizado un screening de la flora fúngica presente en silos de maíz. Los hongos potencialmente toxigénicos aislados pertenecían al género *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. verticillioides*) y sólo se aisló una cepa de *Aspergillus* identificada como *A. fumigatus* (Richard y col., 2007; Richard y col., 2008).

En el presente estudio *A. fumigatus* fue aislado principalmente de sorgo conservado con alto porcentaje de humedad como sistema de almacenamiento: 8,5% del total de aislamientos presentes en el 14.5% de las muestras (Tablas 13b y 14). En menor medida fue aislado de maíz (4.6% de las muestras) representando el 2.5% del total de aislamientos (Tablas 13a y 14). En alfalfa no se detectó desarrollo de *A. fumigatus* (Tablas 13c y 14).

Otros autores si aislaron *A. fumigatus* tanto de forrajes deshidratados como de alimentos fermentados (Cole, 1976; Cole y col., 1977; Dutkiewicz y col., 1989; Whitlow y Hagler, 2002).

En países como Italia y Francia se estudiaron en años sucesivos 1230 muestras de ensilados de maíz en las que se obtuvo *Penicillium roqueforti* como especie dominante, seguido por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Byssochlamys* y *Paecilomyces* (Pelhate, 1975; Pelhate, 1997). En Alemania *P. roqueforti* fue el hongo filamentoso más frecuentemente aislado, seguido por *A. fumigatus*. El predominio de *P. roqueforti* en países europeos fue comprobado en diferentes estaciones del año y por distintos grupos de investigación (Auerbach y col., 1998; Auerbach, 2003). Estudios recientes realizados en Irlanda aislaron *P. roqueforti* como flora predominante en muestras de henolaje de diferentes estados de maduración que presentaban mayor concentración de ácido propiónico que la habitual. Además en aquellas en las que la concentración de ácido láctico era menor a la deseable se encontró presente *Schizophyllum commune* de la familia *Mucoraceae* (O'Brein y col., 2007).

Auerbach (2003) reportó que en ensilados base maíz en los que se evidenció desarrollo de *Monascus ruber* el número de aislamientos de especies del género *Penicillium* fue menor que en aquellos en los que no se presentó. El escaso desarrollo del género *Penicillium* puede atribuirse a que *M. ruber* produciría algún tipo de sustancia inhibitoria. En el presente trabajo de tesis también se observó un aumento en el número de aislamientos de *Penicillium* en los forrajes de maíz, en los que no se aisló *M. ruber* (Tabla 14).

En un estudio de la flora fúngica en muestras de silos de la región de Assiut, Egipto, los autores encontraron que *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor* fueron los géneros más aislados (El - Shanawany y col., 2005).

En estudios realizados en la ciudad de Jalisco, Reyes Velásquez y col. (2006) encontraron que los principales géneros asociados al deterioro de ensilados fueron: *Mucor* spp. (29,2%), *Penicillium* spp. (17.5%) y *Aspergillus* spp. (8.3%), seguidos por *Alternaria* spp. y *Geotrichium* spp.

En un estudio realizado durante un año en Irán en alimentos para animales se observó que la flora fúngica potencialmente toxigénica ascendía al 67%, con predominio de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Khosaravi y col., 2008).

La variabilidad de la micoflora observada en estudios correspondientes a otros autores puede atribuirse a diferentes factores tales como distintas condiciones de siembra y aislamiento, medios de cultivo utilizados, etc.

### **Capacidad toxigénica de hongos aislados de forrajes. Pruebas *in vitro***

Los hongos filamentosos son microorganismos ubicuos en la naturaleza y pueden actuar como saprofitos o patógenos (Scott, 2001). La posibilidad de que estos hongos contaminen los alimentos y puedan producir toxinas en ellos representa una amenaza para la salud humana y animal (Castillo y col., 2004).

A partir de animales alimentados con insumos contaminados con micotoxinas se generan subproductos como carne, leche o huevos que ponen en riesgo la salud humana (Nyamongo y Okioma, 2005).

No todos los hongos que contaminan los alimentos son capaces de producir micotoxinas, ya que su síntesis es afectada por mecanismos regulatorios complejos

además de factores genéticos. Es así que la humedad, el O<sub>2</sub> disponible, el pH y la temperatura pueden ser consideradas como el punto más crítico para controlar durante el almacenamiento de forrajes (Okoli, 2005).

Como medida de control de calidad de los forrajes la identificación de la micoflora contaminante es muy importante ya que proporciona información acerca de que micotoxinas pueden estar presentes o podrían producirse durante el almacenamiento.

Para conocer el riesgo toxigénico de los forrajes analizados en este trabajo de tesis se evaluó la capacidad productora de micotoxinas de las cepas potencialmente productoras aisladas de las 147 muestras estudiadas (Tabla 14). Se investigó la producción de aflatoxinas por el procedimiento sugerido por Scott (1970) modificado por Fulgueira (1998) en las cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Como hongo testigo productor de AF fue utilizado *A. parasiticus* NRRL2999.

Las cepas de *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. semitectum* y *F. solani* fueron evaluadas en su producción de trichotecenos grupo A, B y zearalenona. La producción del principal tricoteceno del grupo A, toxina T-2, de los distintos aislamientos fue determinada por la técnica de Bu'lock y Chulze de Gomez, 1990. Como control positivo de producción se empleó la cepa de *F. sporotrichioides* NRRL 3299.

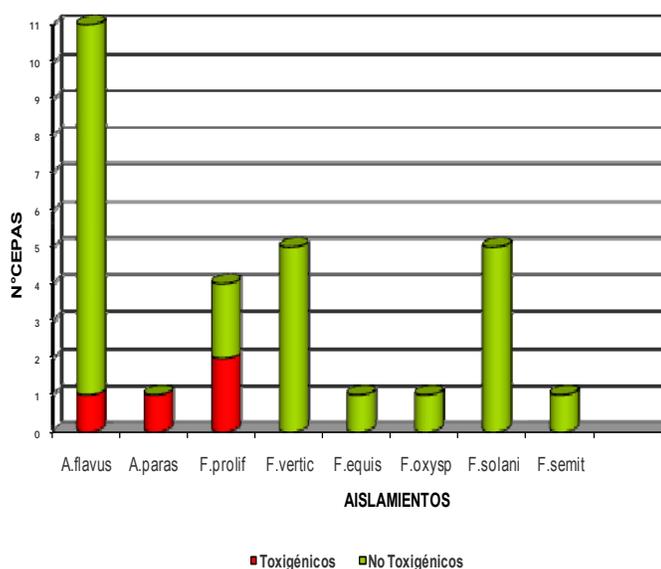
Para la producción de DON (principal tricoteceno del grupo B) y zearalenona se empleó la metodología desarrollada por Lori y col. (1992). Las cepas de *F. semitectum*, *F. oxysporum* y *F. solani* aisladas fueron evaluadas según una modificación de la técnica de Bottalico y col. (1983). Como control positivo de producción se empleó la cepa de *F. graminearum* ITEM 124.

La producción de fumonisinas fue estudiada en los aislamientos de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* por la técnica de Basilico y col. (1996). Se utilizó como testigo positivo *F. proliferatum* NRRL 26191.

Se comprobó la producción de aflatoxinas por 1 de las 11 cepas de *A. flavus* (12M13) y por la cepa de *A. parasiticus* aislada (5M43) y la producción de fumonisinas por 2 de las 4 cepas de *F. proliferatum* (4M2 y 7M12). Ninguna de las 5 cepas de *F. verticillioides* resultó productora (Amigot y col., 2005b).

Los aislados de *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* y *F. solani* resultaron no productores de micotoxinas en las condiciones ensayadas.

La distribución de cepas fúngicas toxigénicas y no toxigénicas evaluadas se presentan en la Fig. 15. Pudo comprobarse que el 13.8% de los aislados presentaron capacidad para producir micotoxinas en las condiciones estudiadas (Amigot y col., 2005b).



**Fig 15:** Estudio de la capacidad productora de micotoxinas de cepas de *Aspergillus* y *Fusarium* aisladas de forrajes almacenados.

Richard y col (2007) en un estudio realizado en Francia observaron que el 52% de la flora fúngica aislada era potencialmente toxigénica. Aproximadamente en el 50% de estos aislamientos se pudo demostrar la capacidad productora.

#### En síntesis

Si bien el número de hongos con capacidad toxigénica probada no fue tan elevado, su presencia en los silos representa un factor de riesgo potencial para la salud humana y animal.

## Presencia de micotoxinas en los ensilados

Se estima que las pérdidas de forrajes debidas a la presencia de micotoxinas superan el billón de toneladas al año. Esto se traduce en pérdidas económicas directas de los forrajes o indirectas por la presencia de micotoxinas residuales en los animales que los ingieren, originando su salida de la cadena alimenticia (Toth y Romvari, 2003). Estas toxinas fúngicas pueden ser producidas a campo o durante el almacenamiento del alimento.

La presencia de hongos filamentosos en los ensilados no implica necesariamente la presencia de micotoxinas en los mismos. Además de estar genéticamente determinadas como cepas productoras de metabolitos tóxicos, los hongos necesitan una serie de factores ambientales adversos para estimular la formación de micotoxinas (Auerbach, 2003). Cuando el O<sub>2</sub>, aún en trazas, penetra al silo los hongos pueden desarrollar y pueden iniciar la producción de micotoxinas. Olivigni y Bullerman (1977) demostraron que la disponibilidad de la fuente carbonada es variable con el tipo de matriz y esto está relacionado con el tipo de toxina que el hongo puede producir. Así por ejemplo el desarrollo de *P. roqueforti* y la producción de roquefortina C se vieron más favorecidos en silos de maíz que en los pastos deshidratados a campo hasta un 35%MS y posteriormente ensilados, denominados “wilted grass” (Muck y Bolsen, 1991).

Niveles de 400µg/kg de DON son considerados riesgosos para vacas lecheras (Gotlieb,1997; Whitlow y Hagler, 1998). Aunque algunos países consideran inaceptables valores de AF>5µg/kg, otros establecen límites más bajos (2.5, 1 o 0µg/kg) (Scudamore y Livesey, 1998; Moss, 2002c; FAO, 2003). Por lo tanto se decidió considerar inapropiadas para la alimentación animal a aquellas muestras de forrajes con:

- Concentración de AF  $\geq 3$  µg/kg o de DON  $\geq 400$  µg/kg o
- Presencia simultánea de ambas micotoxinas aún con valores menores a los expresados en el ítem anterior

Para conocer el grado de contaminación con micotoxinas de las muestras estudiadas se determinó la presencia de AF y de DON mediante enzimo inmuno ensayos (Romers AgraQuant R Aflatoxinas Totales y Biopharm Ridascreen Fast DON).

En la Tabla 13 se muestran las concentraciones de AF y DON en las muestras de forrajes analizados y en la Tabla 15 sus promedios y rangos de concentración presentes en los distintos tipos de matriz.

Estos resultados muestran que una importante contaminación de los ensilados con cepas potencialmente productoras de micotoxinas, no necesariamente concuerda con niveles altos de estos metabolitos, coincidiendo con lo expresado por otros autores (Oude Elferink y col., 2000; Gonzalez Pereyra y col., 2008).

**Tabla 15:** Niveles de micotoxinas en las muestras de forrajes

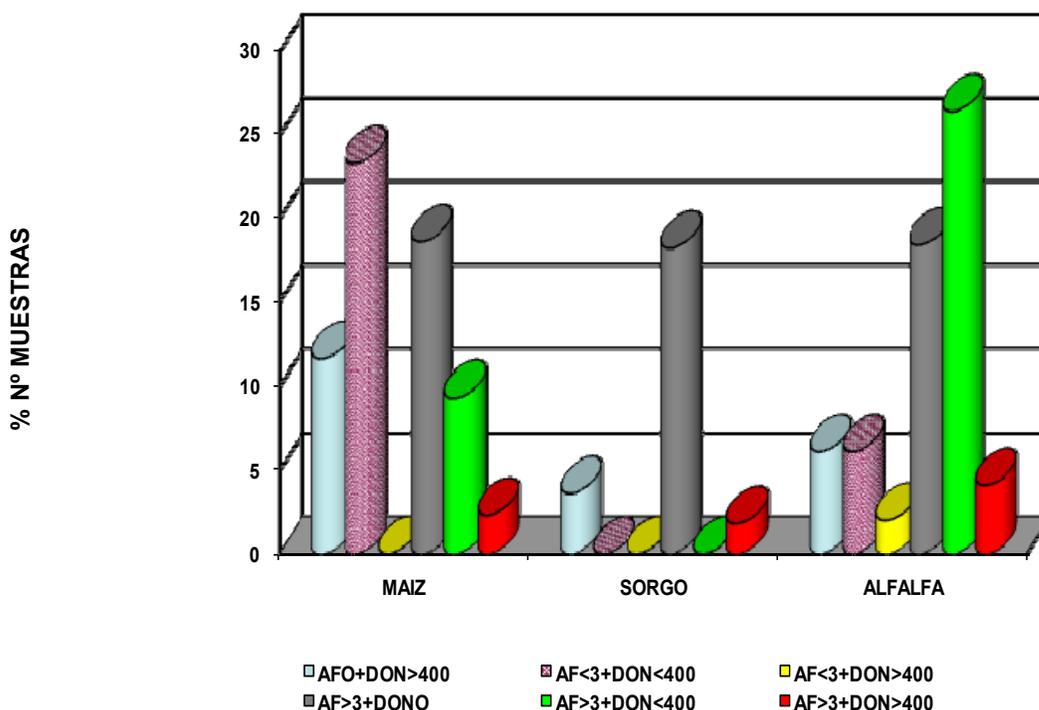
	MATRIZ –FORRAJE					
	MAÍZ		SORGO		ALFALFA	
Concentración (µg/kg)	AF	DON	AF	DON	AF	DON
Promedio general *	2.6 ± 0.5	167.5±52	2.8± 1.5	29.1±15.5	3.8 ±0.5	187±60
Promedio muestras positivas *	4.14±3.33	313±417	11.9±20.23	400±200	5.6±2.96	383±534
Rango	1.0-13.8	100-2000	1.0-80	100- 500	1.4-11.8	100-2000

\*Expresado como promedio ± 1 desviación standard

En los silos de maíz y alfalfa se presentó el número más alto de muestras contaminadas con micotoxinas (65.1% y 63.2%, respectivamente de acuerdo a los criterios establecidos en la página anterior). En la mayoría de ellas se detectó la presencia simultánea de AF y DON (34.9% y 38.7%, respectivamente) (Fig 16). Si bien en los silos de sorgo se observó la menor frecuencia de muestras contaminadas con micotoxinas (23.6%), en este tipo de alimento se registró el valor más alto de contaminación con AF (80µg/kg). Los niveles más altos de DON (2.000µg/kg) se registraron en maíz y alfalfa (Tabla 15).

Si bien la contaminación con AF a niveles riesgosos fue mayor en alfalfa y maíz que en sorgo (39.0%, 30.2% y 20.0%, respectivamente), la incidencia de esta toxina en ausencia de DON fue similar en los 3 sustratos (cerca al 18%). En maíz la co-

ocurrencia de AF y DON a bajos niveles es la forma de contaminación más frecuente (Amigot y col., 2002).



**Fig 16:** Distribución de las muestras con presencia de micotoxinas según la matriz

Niveles similares de incidencia de AF fueron reportados en muestras de sorgo almacenadas en Brasil. da Silva y col. (2000) detectaron AFB1 en el 12.8% de 104 muestras de sorgo con valores que oscilaban entre 7-33 $\mu$ g/kg.

Hell y col. (2000) reportaron que en diferentes zonas agrícolas de Benin, el 41% de las muestras de maíz almacenado presentaban niveles de AF mayores a 2 $\mu$ g/kg, valor ligeramente inferior a los hallados en el presente estudio.

El-Shanawany y col.(2005) estudiaron 40 muestras provenientes de silos de Egipto en la que encontraron que el 35% de ellas estaban contaminadas naturalmente con alguna de las siguientes toxinas: AF(22.5%), toxina T2 (7.5%),y esterigmatocistina (5%), sin registrarse la ocurrencia simultanea de más de 1 toxina.

La contaminación con aflatoxinas en alimentos para ganado ha sido registrada principalmente en ensilados almacenados en climas cálidos.

Sin embargo, las publicaciones más frecuentes sobre la contaminación de forrajes con micotoxinas provienen de regiones templadas a frías donde el uso de ensilados es indispensables como refuerzo de pasturas. En ellas DON es la micotoxina más frecuentemente hallada.

Thomas y col. (1998) reportaron en Vermont una alta incidencia de DON (63 %) en 278 muestras de maíz. Gotlieb (2004) sin embargo, informó años más tarde en estudios realizados en la misma región que aproximadamente el 42% de las muestras de alimentos destinados al consumo animal contenían DON en niveles semejantes a los obtenidos en el presente trabajo (46.5%). Las muestras en su mayoría presentaron niveles inferiores a 1.000 $\mu$ g/kg. Sólo en 15% de ellas el DON presentó niveles superiores a 3.000 $\mu$ g/kg (Gotlieb, 2004).

En Carolina del Norte encontraron que en alimentos destinados al consumo animal las AF se presentaban en el 10,4% de las muestras analizadas, en concentraciones que en algunos casos superaban los 20 $\mu$ g/kg. Para DON la ocurrencia fue del 46,2% con valores iguales o superiores a 500  $\mu$ g/kg (Whitlow y Hagler, 2005). Estos valores no son coincidentes con los hallados en el presente trabajo de tesis, donde la incidencia de AF es superior a la de DON (33.6% y 10,2%, respectivamente considerando las 147 muestras analizadas). Esta diferencia podría atribuirse a que las muestras de USA provienen de zonas con temperaturas más frías.

En ensilados de maíz y trigo, en Holanda, DON fue detectada en el 72% de las muestras. La concentración promedio fue de 854 $\mu$ g/kg y la concentración máxima 3.142 $\mu$ g/kg (Whitlow y Hagler, 2009).

Muchos autores resaltan la co-ocurrencia de varias micotoxinas, situación que puede desencadenar efectos sinérgicos. Por ejemplo, en USA niveles bajos de AF fueron encontrados en el 94% de muestras de ensilados, pero el 59% de ellas fueron positivas también para al menos dos micotoxinas de *Fusarium* (DON, toxina T-2 y zearalenona) (Dairy Business Communications, 2004).

En un estudio previamente citado (Gotlieb, 2004) se reportó la presencia de hasta ocho micotoxinas simultáneamente: DON, OTA, patulina, ácido penicílico, toxina T-2, verrucarina A, zearalenona, y ácido kojico. Estas toxinas estaban

presentes, en combinaciones diferentes en los diferentes sistemas de conservación: henolaje, ensilados de maíz, heno, granos y derivados (Gotlieb, 2004).

En estudios de la contaminación con micotoxinas presentes en silos de maíz de la zona de Normandía, Francia, se detectó la presencia simultánea de AFB<sub>1</sub>, citrinina y DON (Garon y col., 2006); citrinina, DON y gliotoxina (Richard y col., 2007) y AF, citrinina, gliotoxina y DON (Richard y col., 2008).

En investigaciones realizadas en Argentina se encontró que el 33% de 39 muestras de ensilados presentaban DON. Se registró además una incidencia similar de zearalenona y toxina T-2 cercana al 18% (Roigé y col., 2006).

Durante el 2006 fueron analizadas 26 muestras de silo bolsa de maíz provenientes de diferentes zonas de Argentina donde se detectaron micotoxinas con la siguiente distribución: 34.6% AF, 15.3% OTA y 3.8% ZEA. Cabe destacar que en este trabajo no fueron evaluadas la presencia de DON ni la co-ocurrencia de micotoxinas (Venturino y Alvarez, 2007).

Gonzalez Pereyra y col. (2008) informaron la presencia simultánea de AF, zearalenona, DON y fumonisinas en muestras de ensilados de maíz de la región central de Argentina.

#### En síntesis

Los hongos levaduriformes fueron los de mayor aparición en los forrajes, favoreciendo la proliferación de mohos y el deterioro aeróbico del alimento. Entre los hongos filamentosos los posibles toxigénicos fueron los más aislados y dentro de ellos el género *Aspergillus* fue el que se presentó mayoritariamente en los 3 sustratos. El daño que estos hongos pueden producir en la calidad nutritiva de los alimentos tan sólo por su presencia se ve incrementado por la posibilidad de la producción de niveles inaceptables de micotoxinas.

La incidencia de contaminación con micotoxinas (AF, DON y ambas simultáneamente) fue similar para maíz y alfalfa. El porcentaje de muestras contaminadas fue mucho menor en los forrajes de sorgo. Los valores más alto de

DON se presentaron en forrajes base maíz y alfalfa. En los ensilados de sorgo se encontraron las concentraciones más altas de AF.

**Parámetros decisivos para evaluar la calidad de los forrajes. Búsqueda de variables indicadoras de su calidad.**

La productividad animal está directamente relacionada con la calidad de los ingredientes y raciones que componen su dieta (Ward, 2005). El estudio de la calidad de los alimentos conservados es una herramienta necesaria para elaborar programas de nutrición que permitan mejorar la producción de leche o carne. En la mayoría de los establecimientos ganaderos o en los tambos sólo se evalúa la calidad químico-fermentativa del forraje a través de parámetros que incluyen entre otros: pH, aporte energético, proteico y de minerales. Sin embargo su medición y cálculo tienen requerimientos instrumentales y económicos poco accesibles para una evaluación de rutina. Además la posible contaminación con hongos o con micotoxinas sólo es tomada en cuenta cuando afecta la productividad o causa la muerte de los animales. Por todo esto es necesario encontrar parámetros indicadores de la calidad integral de un forraje.

La evaluación químico-fermentativa de las 147 muestras en estudio indicó que un alto porcentaje de ellas fueran clasificadas como “regulares” (Fig 13). En ellas la fermentación inapropiada podría conducir a una mayor concentración fúngica que alteraría el normal funcionamiento del rumen y/o la probabilidad de inhalación de altas concentraciones de propágulos tanto por los animales como por el personal encargado de su cuidado, o la eventual producción de micotoxinas (Puntenney y col., 2003; Adhikari y col., 2004; Frisvald y col., 2006). Esta evaluación genera incertidumbre para decidir la aceptación de un forraje por lo que sería necesario tener en cuenta otras variables. La evaluación conjunta de la calidad químico-fermentativa y los parámetros tóxico-micológicos contribuirían a minimizar este problema.

Para determinar la aceptabilidad final de los forrajes estudiados se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- Se consideraron aceptables (A) aquellas muestras que teniendo una evaluación químico-fermentativa Muy Buena, Buena o Regular, no presentaran ningún parámetro tóxico-micológico alterado.

- Se consideraron muestras riesgosas (Ri) aquellas que presentaron calidad química Mala o las que teniendo una calidad química Muy Buena, Buena o Regular presentaran algún parámetro tóxico-micológico alterado.

Cuando las muestras presentan parámetros químico-fermentativos malos (%  $\text{NH}_3/\text{NT}$  alterado y/o pH aumentado) no son aconsejables para el consumo por sus características nutricionales deficientes lo que evidencia un proceso de fermentación anormal.

Las muestras clasificadas como de MB o B calidad químico-fermentativa podrían presentar parámetros toxico-micológicos alterados debido en algunos casos a la contaminación con hongos y/o micotoxinas de la materia prima, no resultando aconsejables para el consumo.

La Tabla 16 a, b y c muestra la evaluación final de las 147 muestras de forrajes considerando la evaluación químico-fermentativa y la evaluación toxico-micológica en forma conjunta.

**Tabla 16a:** Evaluación final de las muestras de ensilados de maíz

<b>MAÍZ</b>			
<b>Muestras</b>	<b>Evaluación</b>	<b>Evaluación</b>	<b>Evaluación</b>
	<b>Químico-fermentativa</b>	<b>Toxico-micológica</b>	<b>Final</b>
	<b>(1)</b>	<b>(2)</b>	<b>(3)</b>
1	R	A	<b>A</b>
2	R	A	<b>A</b>
3	R	A	<b>A</b>
4	R	A	<b>A</b>
5	M	Ri	<b>Ri</b>
6	R	A	<b>A</b>
7	R	Ri	<b>Ri</b>
8	B	A	<b>A</b>
9	B	A	<b>A</b>
10	R	Ri	<b>Ri</b>
11	R	Ri	<b>Ri</b>
12	R	Ri	<b>Ri</b>
13	R	A	<b>A</b>
14	R	Ri	<b>Ri</b>
15	M	Ri	<b>Ri</b>
16	R	Ri	<b>Ri</b>
17	B	Ri	<b>Ri</b>
18	B	Ri	<b>Ri</b>
19	R	Ri	<b>Ri</b>
20	R	Ri	<b>Ri</b>
21	M	Ri	<b>Ri</b>
22	R	Ri	<b>Ri</b>
23	R	Ri	<b>Ri</b>
24	R	Ri	<b>Ri</b>
25	R	Ri	<b>Ri</b>
26	R	Ri	<b>Ri</b>
27	M	Ri	<b>Ri</b>
28	R	Ri	<b>Ri</b>
29	R	Ri	<b>Ri</b>

**Tabla 16 a(cont):** Evaluación final de las muestras de ensilados de maíz

Muestras	Evaluación	Evaluación	Evaluación
	Químico-fermentativa (1)	Toxico-micológica (2)	Final (3)
30	B	Ri	Ri
31	R	Ri	Ri
32	R	Ri	Ri
33	M	A	Ri
34	R	Ri	Ri
35	B	A	A
36	B	A	A
37	R	Ri	Ri
38	R	Ri	Ri
39	R	Ri	Ri
40	B	A	A
41	R	Ri	Ri
42	R	Ri	Ri
43	B	Ri	Ri

(1) de acuerdo a la Tabla 12

(2) de acuerdo a la Tabla 13

(3) A: (1) B o MB o R y (2) A

Ri: (1) M o (1) MB, B o R y (2) Ri

**Tabla 16b:** Evaluación final de las muestras de ensilados de sorgo

<b>SORGO</b>			
<b>Muestras</b>	<b>Evaluación</b>	<b>Evaluación</b>	<b>Evaluación</b>
	<b>Químico-fermentativa</b>	<b>Toxico-micológica</b>	<b>Final</b>
	<b>(1)</b>	<b>(2)</b>	<b>(3)</b>
1	MB	A	<b>A</b>
2	R	A	<b>A</b>
3	R	A	<b>A</b>
4	R	A	<b>A</b>
5	M	A	<b>Ri</b>
6	R	A	<b>A</b>
7	R	Ri	<b>Ri</b>
8	R	Ri	<b>Ri</b>
9	R	Ri	<b>Ri</b>
10	R	Ri	<b>Ri</b>
11	R	Ri	<b>Ri</b>
12	R	A	<b>A</b>
13	R	Ri	<b>Ri</b>
14	R	R	<b>Ri</b>
15	R	A	<b>A</b>
16	R	A	<b>A</b>
17	R	A	<b>A</b>
18	R	A	<b>A</b>
19	B	A	<b>A</b>
20	R	A	<b>A</b>
21	B	A	<b>A</b>
22	R	A	<b>A</b>
23	R	A	<b>A</b>
24	R	A	<b>A</b>
25	R	A	<b>A</b>
26	R	A	<b>A</b>
27	B	A	<b>A</b>
28	B	A	<b>A</b>
29	MB	A	<b>A</b>
30	R	Ri	<b>Ri</b>
31	R	Ri	<b>Ri</b>
32	R	Ri	<b>Ri</b>
33	R	A	<b>A</b>
34	B	A	<b>A</b>

**Tabla 16b (cont):** Evaluación final de las muestras de ensilados de sorgo

Muestras	Evaluación	Evaluación	Evaluación
	Químico-fermentativa (1)	Toxico-micológica (2)	Final (3)
35	R	Ri	Ri
36	MB	A	A
37	MB	A	A
38	R	Ri	Ri
39	R	A	A
40	R	Ri	Ri
41	B	A	A
42	R	Ri	Ri
43	M	A	Ri
44	R	A	A
45	M	A	Ri
46	M	Ri	Ri
47	R	Ri	Ri
48	R	A	A
49	M	Ri	Ri
50	B	A	A
51	B	A	A
52	R	Ri	Ri
53	R	Ri	Ri
54	R	A	A
55	R	A	A

(1) de acuerdo a la Tabla 12

(2) de acuerdo a la Tabla 13

(3) A: (1) B o MB o R y (2) A

Ri: (1) M o (1) R y (2) Ri

Tabla 16c: Evaluación final de las muestras de ensilados de alfalfa.

<b>ALFALFA</b>			
Muestras	Evaluación	Evaluación	Evaluación
	Químico-fermentativa	Toxico-micológica	Final
	(1)	(2)	(3)
1	M	Ri	Ri
2	M	Ri	Ri
3	R	A	A
4	M	A	Ri
5	R	A	A
6	R	A	A
7	B	A	A
8	M	Ri	Ri
9	MB	A	A
10	B	A	A
11	R	Ri	Ri
12	M	Ri	Ri
13	M	A	Ri
14	M	Ri	Ri
15	M	Ri	Ri
16	M	A	Ri
17	R	Ri	Ri
18	M	Ri	Ri
19	M	Ri	Ri
20	R	Ri	Ri
21	M	Ri	Ri
22	R	Ri	Ri
23	M	Ri	Ri
24	M	Ri	Ri
25	M	Ri	Ri
26	R	Ri	Ri
27	R	Ri	Ri
28	M	Ri	Ri
29	M	Ri	Ri
30	M	A	Ri
31	R	A	A
32	R	A	A
33	R	A	A

**Tabla 16c (cont):** Evaluación final de las muestras de ensilados de alfalfa

<b>Muestras</b>	<b>Evaluación Qco-Ferm (1)</b>	<b>Evaluación Toxico-micol (2)</b>	<b>Evaluación Final (3)</b>
34	R	Ri	<b>Ri</b>
35	R	Ri	<b>Ri</b>
36	M	Ri	<b>Ri</b>
37	M	A	<b>Ri</b>
38	M	Ri	<b>Ri</b>
39	M	Ri	<b>Ri</b>
40	M	Ri	<b>Ri</b>
41	M	Ri	<b>Ri</b>
42	R	Ri	<b>Ri</b>
43	R	Ri	<b>Ri</b>
44	R	Ri	<b>Ri</b>
45	M	Ri	<b>Ri</b>
46	R	Ri	<b>Ri</b>
47	R	Ri	<b>Ri</b>
48	R	Ri	<b>Ri</b>
49	M	Ri	<b>Ri</b>

(4) de acuerdo a la Tabla 12

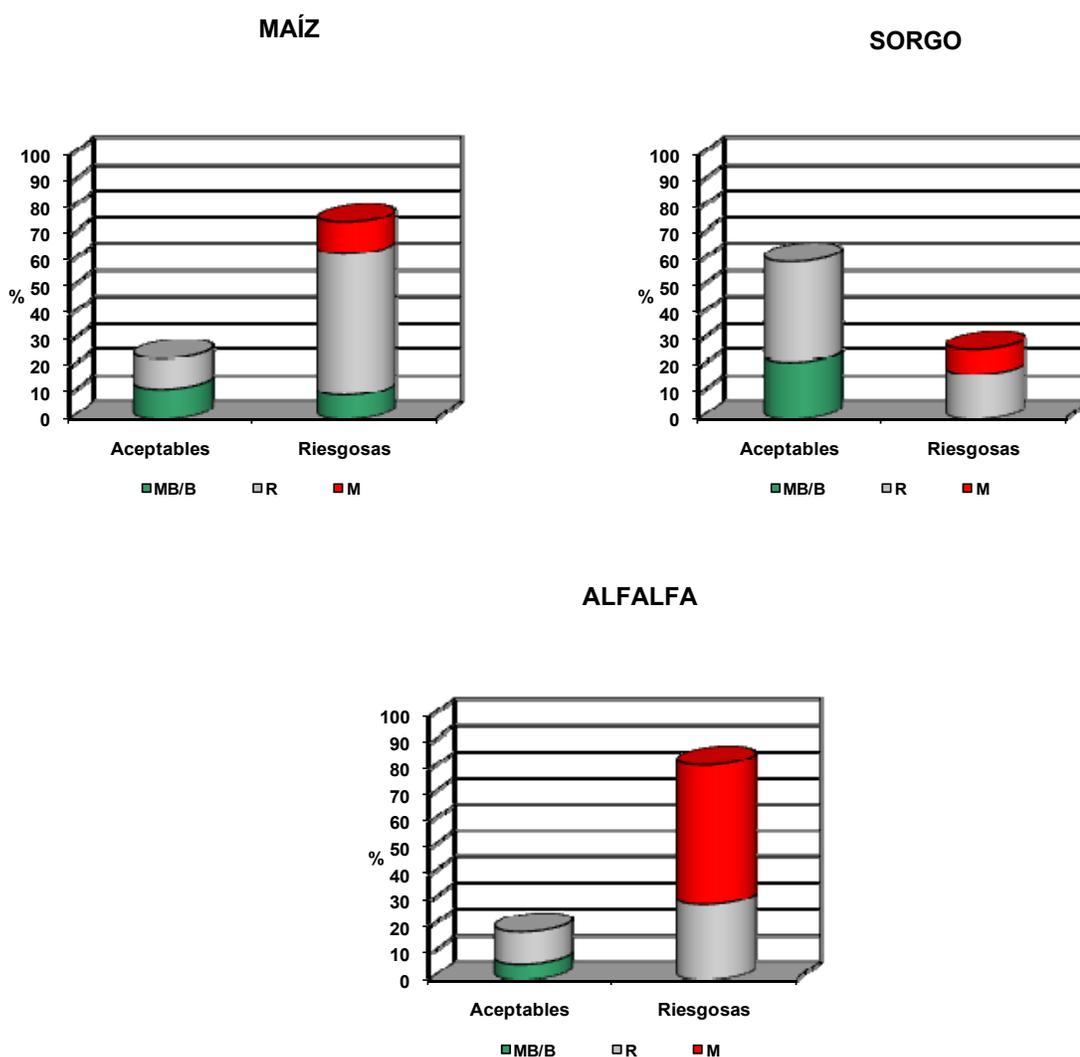
(5) de acuerdo a la Tabla 13

(6) A: (1) B o MB o R y (2) A

Ri: (1) M o (1) MB, B o R y (2) Ri

El análisis de la asociación entre las variables químico-fermentativas y tóxico-micológicas fue realizado por el test Exacto de Fischer (Stokes y col., 2000).

La información presentada en las Tablas 16 a, b y c se sintetiza gráficamente en la Fig 17. Es así como los silos de calidad Muy Buena, Buena o Regular pueden ser clasificados como A o Ri para el consumo utilizando más variables que las del tipo químico-fermentativo (Fig 13 y17).



**Fig 17:** Evaluación final como A o Ri de muestras de forrajes calificadas químico-fermentativamente como Muy Buenas / Buenas (**MB/B**), Regulares (**R**) o Malas (**M**)

Las muestras de sorgo y alfalfa que fueron clasificadas químico-fermentativamente como de calidad Muy Buena o Buena no presentaron ninguna de las variables tóxico-micológicas afectadas, razón por la cual fueron consideradas A. En este caso no sería necesaria la evaluación microbiológica. Teniendo en cuenta que algunos alimentos a base de maíz, químicamente calificados como MB o B presentaron parámetros tóxico-micológicos alterados, en estos casos sí resultaría necesario el análisis de dichas variables para definir su aceptación.

En las muestras con calidad químico-fermentativa R el análisis tóxico-micológico es indispensable.

En la búsqueda de nuevas variables indicadoras de la calidad de un alimento, como una herramienta útil para desarrollar una rápida evaluación de la cadena de producción, en este trabajo de Tesis, se pudo establecer ( $p < 0.05$ ) que en las muestras de maíz y de alfalfa DON + AF resultan suficientes para conocer la calidad "final" del ensilado (Amigot y col., 2003; Amigot y col., 2004; Amigot y col., 2006; Amigot y col., 2007). Otros autores (Gaggiotti y col., 2007) comprobaron que DON no resultaba por sí solo un buen parámetro indicador de ocurrencia de otras toxinas cuando se analizaban forrajes conservados provenientes de la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe.

Para todas las muestras de sorgo de calidad químico-fermentativa R se pudo concluir ( $p < 0.05$ ) que es necesario determinar el recuento de UFC/g, la presencia de *A. fumigatus* y la concentración de AF para conocer la calidad final de los alimentos.

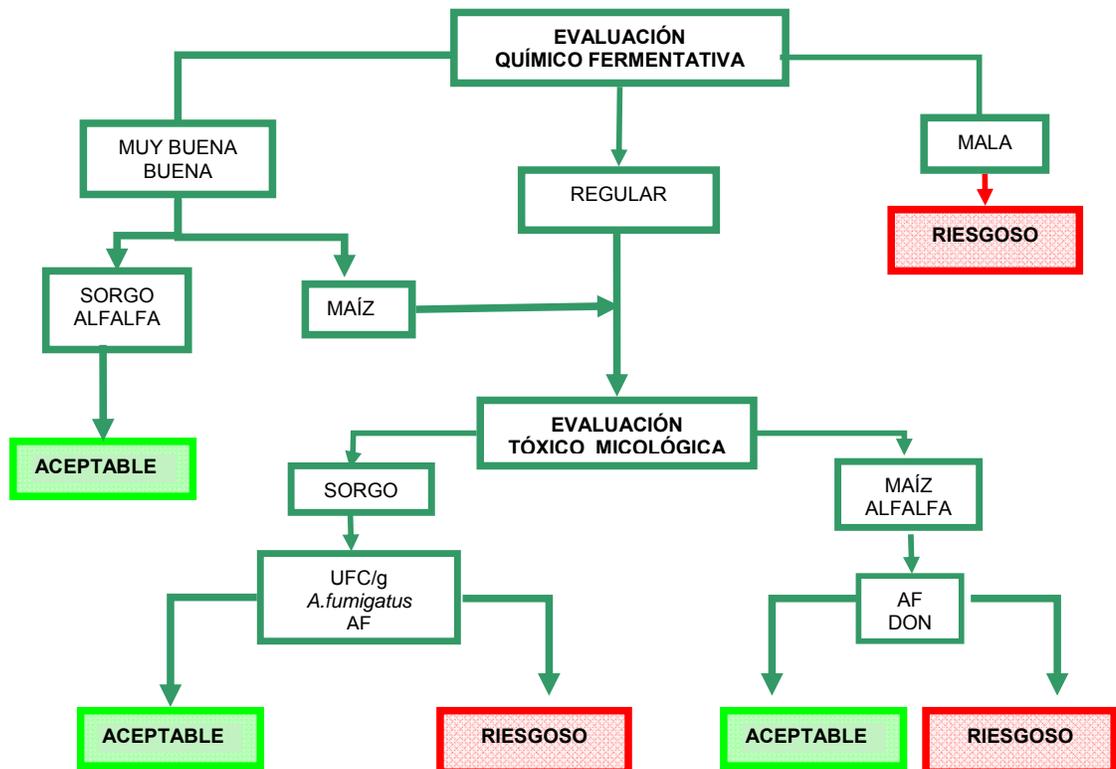
#### En síntesis

La evaluación de la calidad químico-fermentativa resultó insuficiente para obtener la calificación final de los forrajes, con excepción de las muestras de calidad Mala que deben ser rechazadas por no ser aptas para el consumo, independientemente de su evaluación toxico-micológica.

La evaluación de los parámetros toxico-micológicos tampoco es suficiente para decidir la aceptabilidad ya que se reportaron muestras aceptables pero de mala calidad químico fermentativa.

Se pudo determinar que el análisis conjunto de los parámetros químico-fermentativos y los parámetros toxico-micológicos permite decidir de manera sencilla la aceptabilidad de un forraje para su utilización en la alimentación animal,

proponiéndose el siguiente esquema de análisis para forrajes de maíz, sorgo y alfalfa (Fig 18) (Amigot y col., 2005c, Amigot y col., 2006).



**Fig 18:** Algoritmo de trabajo para evaluar la calidad de un forraje.

- **CONTROL BIOLÓGICO DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA EN FORRAJES**
- 
- Con el desarrollo de la agricultura la flora autóctona se vio desplazada para permitir el desarrollo de cultivos más redituables. El hombre ha manipulado la naturaleza para su beneficio alterando no sólo la biodiversidad sino también la composición de los ecosistemas naturales. La naturaleza ha respondido favoreciendo el desarrollo de plagas y pestes para controlar a estos cultivos “antinaturales”. Para contrarrestar la acción de los patógenos, el hombre ha desarrollado a lo largo del tiempo distintas estrategias entre las que se encuentran la rotación de cultivos, el uso de agentes químicos, etc. Sin embargo los pesticidas químicos contaminan los sistemas acuíferos y presentan efectos nocivos sobre los animales y el hombre como por ejemplo intoxicaciones o cáncer (CAST, 2003).
- Se estima que entre el 15 y el 20% de la producción agrícola mundial se pierde por la acción de hongos fitopatógenos y toxigénicos, razón por la que se los debe controlar con acciones o productos “respetuosos” del medioambiente. El surgimiento del control biológico como una nueva forma de control de enfermedades y plagas más inocua se presenta como una herramienta más promisoría para una agricultura ecológica (Montesinos y Bonaterra, 2009).
- El desarrollo de pesticidas microbiológicos (biopesticidas) involucra muchas etapas: aislamiento, identificación, caracterización en cultivos puros del agente de biocontrol, búsqueda de bioensayos efectivos que permitan la “trazabilidad” del biocontrolador, etc. (Montesinos, 2003).
- 
- 
- ***Control biológico de hongos toxigénicos in vitro***
- 
- **Evaluación de la actividad antagonista de cepas de *Streptomyces* spp. frente a cepas fúngicas de capacidad toxigénica probada**
- Para el aislamiento de potenciales agentes de biocontrol se recomienda el muestreo de áreas apropiadas tales como aquellas zonas donde el patógeno ha sido inhibido o aquellos cultivos que, aún en áreas de epidemia, no fueron atacados. El agente aislado debe ser capaz de interferir en el ciclo biológico del

patógeno. La selección debe realizarse en medios apropiados para obtener desarrollos puros (Montesinos, 2003).

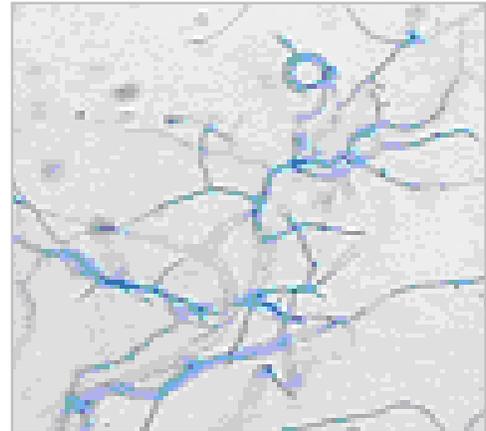
- Para el aislamiento de cepas de *Streptomyces* se utilizaron muestras de suelo de cultivo de cereales, huertas orgánicas y suelo sin cultivar. El aislamiento de las cepas de *Actinomycetes* fue realizado de acuerdo con la técnica de Panthier y col. (1979). Entre los *Actinomycetes* aislados se seleccionaron 41 cepas que por sus características macro y microscópicas eran compatibles con el género *Streptomyces* (Williams y col., 1989) (Fig 19 a y b).

- 

- 

- a)

- b)

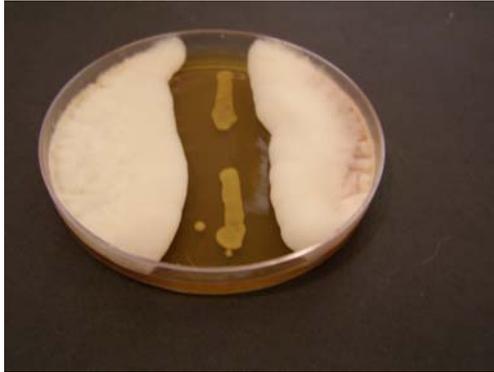


- **Fig 19:** a) Macromorfología de cepas de *Streptomyces* en APD b) Micromorfología de *Streptomyces* C/33-6 (400X) coloreado con azul de algodón.

- 

- El bioensayo empleado para seleccionar potenciales biocontroladores consistió en enfrentar conidios de los hongos con capacidad toxigénica probada con cada una de las cepas de *Streptomyces* previamente desarrolladas en APD. También se evaluó la actividad antagonista de *Streptomyces* frente a dos cepas de *A. fumigatus* aisladas. Se efectuaron 6 repeticiones de cada combinación *Streptomyces* - hongo (Fig 20).

▪ a)



b)



▪

- **Fig 20:** Bioensayo empleado para seleccionar cepas de *Streptomyces* potenciales biocontroladores fúngicos. a) Cepa de *Streptomyces* C/33-6 con actividad antagonista de *F. proliferatum* b) Cepa de *Streptomyces* 506 sin actividad antagonista frente a *A. flavus* 12M10.

▪

▪

- Los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición correspondientes a aquellas cepas de *Streptomyces* que inhibieron al menos a un hongo toxigénico se presentan en la Tabla 17.

▪ **Tabla 17:** Actividad antifúngica producida por las cepas de *Streptomyces* frente a hongos toxigénicos

Streptomyces	Diametro de la zona de inhibición (mm)						
	Hongo						
	<i>A.fumigatus</i> 15 M 7	<i>A.parasiticus</i> 5 M43	<i>A.flavus</i> 12 M10	<i>F.proliferatum</i> 4 M2	<i>F.proliferatum</i> 7 M12	<i>F.graminearum</i> ITEM 124	<i>F.sporotrichioides</i> NRRL 3299
33-6	15,83 ± 3,31	11,5 ± 3,94	2,50 ± 0,55	15,83 ± 3,31	6,67 ± 0,52	10,83 ± 0,98	13,67 ± 1,21
101	0,33 ± 0,52	0	0	0	0	0	5,58 ± 0,92
103	1,17 ± 0,98	2,33 ± 0,52	0,67 ± 1,03	4,67 ± 1,86	6,83 ± 0,98	11,25 ± 1,25	18,50 ± 1,64
105	2,00 ± 0,05	0	0	6,17 ± 1,17	0	4,17 ± 0,75	6,25 ± 0,76
108	0	0	0	0	0	0,17 ± 0,41	0,17 ± 0,41
110	0	0	0	0	0	0	2,83 ± 0,68
111	1,50 ± 0,55	0	0	3,00 ± 0,09	0,33 ± 0,52	0	0
112	0	0	0	0	0	8,00 ± 1,41	0
113	0	1,67 ± 0,52	0	0	0	1,83 ± 0,75	1,50 ± 0,55
114	0,67 ± 1,03	0,50 ± 0,84	0	4,25 ± 1,33	3,00 ± 0,89	8,50 ± 1,64	5,00 ± 0,89
201	0	0,33 ± 0,52	0	0	0	0	0
202	12,50 ± 2,26	1,33 ± 0,52	8,33 ± 1,97	14,83 ± 0,98	12,50 ± 2,43	0	20,50 ± 1,87
203	1,08 ± 1,69	0	0	1,08 ± 1,69	0,58 ± 1,43	0	0
205	0	1,67 ± 1,37	0	0	0	0,33 ± 0,52	0
208	4,00 ± 0,63	2,17 ± 1,94	3,33 ± 2,16	5,33 ± 1,03	3,75 ± 1,60	8,25 ± 0,88	8,08 ± 0,92
210	0	0	0	0	0	0	3,17 ± 0,82
212	0	1,00 ± 0,89	0	0	0	0	0
301	4,50 ± 0,55	1,00 ± 1,26	0,67 ± 1,03	6,33 ± 0,52	8,00 ± 2,90	5,83 ± 0,75	11,17 ± 0,98

▪ \*medida en mm de inhibición y expresado en promedio de 6 repeticiones ± 1 desviación Standard

- **Tabla 17 (cont):** Actividad antifúngica producida por las cepas de *Streptomyces* frente a hongos toxigénicos

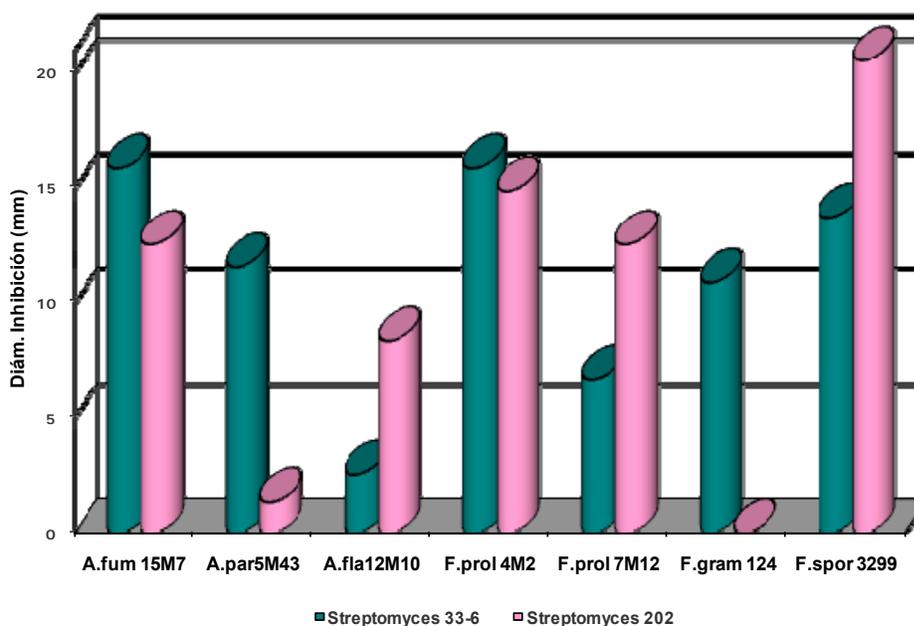
Streptomyces	Diametro de la zona de inhibición (mm)						
	Hongo						
	<i>A.fumigatus</i> 15 M 7	<i>A.parasiticus</i> 5 M43	<i>A.flavus</i> 12 M10	<i>F.proliferatum</i> 4 M2	<i>F.proliferatum</i> 7 M12	<i>F.graminearum</i> ITEM 124	<i>F.sporotrichioides</i> NRRL 3299
303	0	0	0	0	0	0	0
304	0	1,00 ± 0,89	1,83 ± 0,41	0	0	0	0
305	0	0	0	0,50 ± 0,84	0	0	0
306	0	0	0	0	0	0,67 ± 0,52	0
501	0	0,50 ± 0,84	0	0	0	1,33 ± 0,52	0
502	0,50 ± 0,55	1,17 ± 1,17	0	0	0	0	0
503	0	0	0	0	0	0	0
504	0,67 ± 0,52	3,17 ± 1,17	3,50 ± 0,55	4,83 ± 1,94	0	0	0
505	0	1,17 ± 0,41	4,50 ± 3,21	0	0	1,50 ± 0,55	0
506	0	0	0	0,42 ± 0,66	0	0	0
508	0	0	0	0	0	0,67 ± 0,82	0
509	0	0,83 ± 1,33	0	0	0	0	0
510	0	0,50 ± 0,84	0,33 ± 0,52	0	0	0	0
601	0,33 ± 0,52	0	0	0	0	0	0
602	0	0	0	0	0	0	0

- \*medida en mm de inhibición y expresado en promedio de 6 repeticiones ± 1 desviación Standard

- 

-

- Los resultados de las seis repeticiones de cada bioensayo se compararon mediante un ANOVA para un diseño a estructura cruzada y posterior aplicación de comparaciones múltiples por el método de Scheffé (Montgomery, 1995).
- Se detectó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad antifúngica producida por las diferentes cepas de *Streptomyces*, destacándose la fuerte inhibición producida por las cepas 33-6 y 202 (Fig 21).



▪ **Fig 21:** Inhibición producida por las cepas de *Streptomyces* de mayor actividad antifúngica

- La efectividad de la cepa de *Streptomyces* C/33-6 ya había sido comprobada frente a hongos toxigénicos en invernáculo (Borghini y col., 1992; Fulgueira y col., 1996). Además su actividad inhibidora fue caracterizada como fungicida, no quitinolítica producida por compuestos de naturaleza proteica (Acosta, 2005).
- Por lo tanto la cepa de *Streptomyces* C/33-6 fue seleccionada como potencial biocontrolador para posteriores estudios en microsilos experimentales.

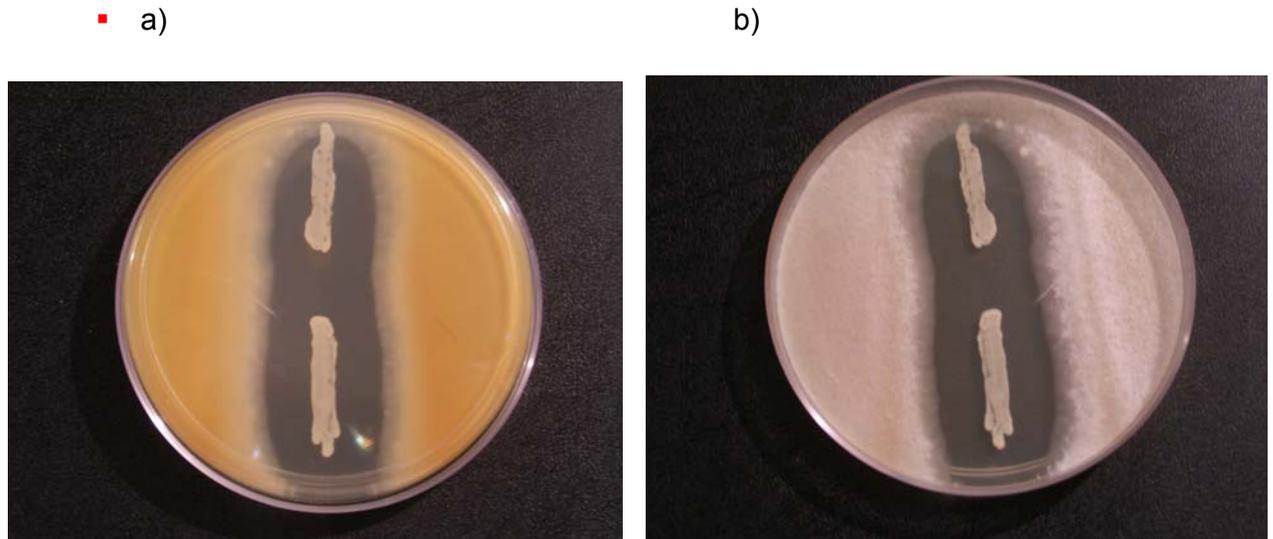
- **Evaluación de la actividad de cepas de BAL frente a cepas fúngicas de capacidad toxigénica probada y a *Streptomyces* sp. C/33-6 seleccionado como potencial agente de biocontrol**
- 
- Si bien la fermentación del material ensilado ocurre naturalmente por la presencia de BAL epífitas, cuyo número varía significativamente durante la cosecha y el ensilado, la velocidad y eficiencia en la fermentación es variable dependiendo del número y tipo de BAL presentes en el cultivo (Muck, 2004). Algunas particularidades del material a ensilar (sustrato) como disponibilidad de azúcares y contenido de MS, y las características fermentativas del grupo BAL presente influirán en su capacidad competitiva durante la fermentación del ensilado (Oude Elferink y col., 1999a). La presencia de BAL homofermentadoras favorece el descenso rápido del pH inhibiendo el desarrollo de bacterias nocivas que pueden actuar como patógenos o provocar deterioro de la calidad del alimento (Muck y Holmes, 2006). Algunos autores relacionan el efecto antimicrobiano de las BAL con la producción de ácido láctico y ácido acético o con subproductos de actividad metabólica tales como peróxido de hidrógeno o bacteriocinas (Ström y col., 2005; Onilude y col., 2005). Además ha sido comprobado que la presencia de BAL heterofermentadoras favorece la preservación en la etapa de estabilidad aeróbica y suministro (Hoffman y Combs, 2001; Muck y Holmes, 2006).
- En el presente estudio el aislamiento de cepas de BAL se realizó a partir de silos de buena calidad empleando la técnica de diluciones sucesivas y siembra en agar MRS, a 37°C en bolsas de anaerobiosis. Se seleccionaron 9 cepas con características de BAL: cocos G(+) y bacilos G(+) catalasa (-), para realizar los ensayos de inhibición en placa. Su actividad inhibidora fue ensayada frente a 4 hongos toxigénicos (*A. parasiticus* 5M43, *A. flavus* 12M10 y *Fusarium proliferatum* 4M2 y 7M12) y un patógeno humano y animal (*A. fumigatus* 15M7) aislados de silos y 2 hongos toxicogénicos de colección (*F. sporotrichoides* NRRL3299 y *F. graminearum* ITEM124) y frente a *Streptomyces* C/33-6 por el método “overlay” modificado de Magnusson y Schnurer (2001). La Tabla 18

muestra los diámetros de las zonas de inhibición obtenidas y la Fig 22 ejemplifica una de las interacciones.

▪ **Tabla 18:** Actividad inhibidora producida por las cepas de BAL frente a los hongos toxigénicos y *Streptomyces* C/33-6

BAL	Diametro de la zona de inhibición (mm)							
	Microorganismo							
	<i>Streptomyces</i> C/33-6	<i>A.fumigatus</i> 15 M 7	<i>A.parasiticus</i> 5 M43	<i>A.flavus</i> 12 M10	<i>F.proliferatum</i> 4 M2	<i>F.proliferatum</i> 7 M12	<i>F.graminearum</i> ITEM 124	<i>F.sporotrichioides</i> NRRL 3299
1	0	0	4.13 ± 1.03	0	6.2 ± 1.95	8.00 ± 2.45	20.25 ± 4.92	19.50 ± 8.19
2	0	0	4.5 ± 1.91	0	5.91 ± 1.38	8.00 ± 2.45	23.50 ± 4.80	21.50 ± 0.71
3	0	1.77 ± 0.89	6.13 ± 1.03	1.38 ± 0.48	1.63 ± 0.98	2.50 ± 2.51	18.75 ± 4.65	11.50 ± 0.71
4	5.00 ± 0.82	2.65 ± 1.15	6.13 ± 1.31	1.63 ± 0.48	2.95 ± 2.56	3.75 ± 4.35	15 ± 1.41	13 ± 3.56
5	2.0±0.42	2.86 ±0.78	5.13 ± 1.03	0	4.95 ± 0.93	6.67 ± 1.03	19.50 ± 7.55	10±2.70
6	9.25 ± 0.96	0	6.88 ± 1.75	0	1.05 ± 0.67	1.25 ± 0.96	17.75 ± 4.86	13.50 ± 3.00
7	0	4.06 ± 3.22	6.88 ± 2.66	2.75 ± 0.65	8.65 ± 2.08	10 ± 1.63	19.75 ± 6.24	15.25 ± 2.22
8	4.50 ± 5.26	1.85 ± 0.97	2.00± 1.06	0	4.74 ± 2.12	5.75 ± 2.50	17.25 ± 6.95	13.50 ± 1.29
9	0	0	3.88 ± 1.89	0	5.3 ± 1.76	6.50 ± 1.91	16 ± 3.37	8.2±1.35

▪ \*medida en mm de inhibición y expresado en promedio de 4 repeticiones ± 1 desviación Standard



- **Fig 22:** Bioensayo empleado para seleccionar cepas de BAL potenciales biocontroladores fúngicos. Interacción BAL/7- *F. proliferatum* 7M12 a) reverso b) anverso

- 
- 
- El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad inhibidora se efectuó para cada hongo mediante un ANOVA unifactorial. Los supuestos fueron validados a través del análisis de residuos. En caso de no cumplimiento de los mismos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Las técnicas de comparaciones múltiples utilizadas fueron la de Tukey para el ANOVA basada en la variable F de Snedecor y la desarrollada a partir de la suma de rangos de Kruskal-Wallis en el segundo caso. Las diferencias fueron consideradas como significativas cuando  $p < 0.05$ .
- Las cepas de BAL 1, 2, 3, 7 y 9 no produjeron inhibición del *Streptomyces* C/33-6. El resto de las cepas produjeron diámetros promedios significativamente mayores que cero.
- Por presentar fuerte actividad inhibidora frente a los hongos toxigénicos y carecerla frente a *Streptomyces* C/33-6, se seleccionó a la cepa BAL/7 para ser ensayada como agente de biocontrol en microsilos experimentales.
- La cepa de BAL/7 fue remitida al Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) para su identificación genética. El análisis comparativo de las secuencias descritas en las diferentes bases de datos mostró una elevada

identidad (>0.95) con cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* y dentro de éste con la especie *Lactobacillus buchneri* (Apéndice ).

- 
- 
- En síntesis:
- En la búsqueda de potenciales biocontroladores de hongos toxigénicos fue seleccionada una cepa de *Streptomyces*, C/33-6, por presentar una fuerte actividad antagonista.
- También se ensayó la capacidad biocontroladora de hongos toxigénicos de cepas de BAL, seleccionando a BAL/7 por presentar fuerte inhibición frente a todas las cepas de hongos ensayadas y no inhibir a *Streptomyces* sp. C/33-6.
-

**Control biológico de hongos toxigénicos en microsilos experimentales (ME).**

Cuando se estudió la calidad de los alimentos conservados destinados al consumo de ganado de la cuenca lechera de la provincia de Santa Fe se determinó que alfalfa y maíz resultaron los sustratos más contaminados. Entre estos dos sustratos se decidió utilizar maíz como matriz de los ME ya que los ensilados de planta entera de maíz proporcionan al ganado alimentos con altos niveles de energía y con alta MS por unidad de siembra. Si bien el valor nutritivo varía con la proporción de granos, el contenido de fibra, de almidón, de grasas y de proteínas, el fácil manejo del cultivo y la posibilidad de mecanización de la cosecha han incrementado notablemente su popularidad como material ensilable. El uso de ensilados de maíz presenta ventajas sobre otros alimentos destinados al consumo animal: pueden conservarse por más tiempo y permiten obtener raciones más nutritivas a menores costos (Weiss, 2001; Schawab y Schaver, 2001).

Para disminuir la contaminación y mejorar la calidad de los ME se ensayó una estrategia más inocua que el control químico como es el uso de agentes de biocontrol. Se seleccionó para esta etapa como hongo toxigénico a controlar, una cepa de *Aspergillus* sección *Flavi* por presentar una mayor capacidad para producir conidios en medios y condiciones sencillas que el género *Fusarium* y por disponer de un medio de cultivo diferencial AFPA, que permitiría seguir la trazabilidad de la cepa durante el ensayo. Teniendo en cuenta que las cepas *A. parasiticus* son en casi su totalidad productoras de AF, se decidió seleccionar *A. parasiticus* 5M43 para los ensayos posteriores (Gourama y Bullerman, 1995). Como potenciales agentes de biocontrol se emplearon *Streptomyces* C/33-6 y *Lactobacillus buchneri* BAL/7.

**Búsqueda del mejor carrier para inocular los microorganismos.**

Para seleccionar el carrier o vehículo más apropiado para inocular los microorganismos (contaminantes y biocontroladores) en los microsilos experimentales, se decidió estudiar la viabilidad del *A. parasiticus* 5M43 y del

*Streptomyces* C/33-6 sobre dos sustratos: alfalfa y maíz. Las matrices estudiadas fueron molidas y esterilizadas para la realización del ensayo.

Alicuotas de ambos sustratos fueron inoculados con suspensiones de *A. parasiticus* 5M43 y de *Streptomyces* C/33-6 incubados a 28°C. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. A las 0, 24 y 48 hs de incubación se tomaron muestras de todos los tratamientos y se efectuó el recuento de UFC/g de sustrato empleando la técnica de diluciones sucesivas. Para el recuento de *Aspergillus* grupo *flavus* (Tabla 19) se utilizó AFPA como medio de cultivo y para los *Streptomyces*, APD (Tabla 20).

**Tabla 19:** Recuento total de *Aspergillus* grupo *flavus* \*(UFC/g de sustrato) (Todos los valores son x 10<sup>7</sup>)

MATRIZ	TIEMPO		
	Inicial	24 hs.	48 hs.
Maíz	17.5 ± 2.12	10 ± 0.85	7.62 ± 1.24
Alfalfa	2.37 ± 1.52	2.4 ± 1.75	1.5 ± 2

\*expresados como promedio de 2 repeticiones ± 1 desviación standard

**Tabla 20:** Recuento total de *Streptomyces* \* (UFC/g de sustrato) (Todos los valores son x 10<sup>8</sup>)

MATRIZ	TIEMPO		
	Inicial	24 hs.	48 hs.
Maíz	52.25 ± 14.50	19.3 ± 1.70	9.16 ± 0.59
Alfalfa	26.8 ± 7.35	8.4 ± 0.57	4.55 ± 1.91

\*expresados como promedio de 2 repeticiones ± 1 desviación standard

De acuerdo a los estudios estadísticos efectuados por la técnica de Tuckey se pudo concluir que la recuperación de *Aspergillus* grupo *flavus* en maíz fue significativamente mayor en todos los tiempos ensayados que cuando se utilizó alfalfa ( $p < 0.001$ ).

Para *Streptomyces* spp. también se pudo concluir que la recuperación del agente fue significativamente mayor en maíz que en alfalfa ( $p < 0.01$ ).

Si bien la recuperación de *Aspergillus* grupo *flavus* no varió significativamente a las 24hs de incubación a T° ambiente, la viabilidad de *Streptomyces* sí decreció ( $p < 0,05$ ). Estos resultados mostraron la necesidad de efectuar la inoculación de los microorganismos en los silos antes de cumplidas la 24hs de preparación de los carriers.

#### En síntesis

El maíz resultó mejor vehículo para inocular el agente patógeno y el de biocontrol en el armado de los ME.

### Ensayo en ME de planta entera de maíz

Los microsilos reproducen a pequeña escala las condiciones de compactación, aireación y conservación alcanzadas en los silos tradicionales.

Se diseñó un experimento para evaluar el efecto producido por un hongo toxigénico, *A. parasiticus* 5M43, y dos potenciales biocontroladores (PBC), *Streptomyces* C/33-6 y *Lactobacillus buchneri* BAL/7, sobre ME de planta entera de maíz de acuerdo a las siguientes combinaciones de microorganismos (tratamientos):

- 1) Control
- 2) *Streptomyces* C/33-6 (PBC1)
- 3) *Lactobacillus buchneri* BAL/7 (PBC2)
- 4) *Aspergillus parasiticus* 5M43 (productor de aflatoxinas)
- 5) *Streptomyces* C/33-6 + *A. parasiticus* 5M43
- 6) *Lactobacillus buchneri* BAL/7 + *A. parasiticus* 5M43
- 7) *Streptomyces* C/33-6 + *Lactobacillus buchneri* BAL/7
- 8) *Streptomyces* C/33-6 + *Lactobacillus buchneri* BAL/7 + *A. parasiticus* 5M43

Cada tratamiento fue aplicado por duplicado simulando condiciones apropiadas (anaerobias) e inapropiadas (aerobias) de compactación y oxigenación.

#### Preparación de los inóculos

Para obtener propágulos de la cepa de *A. parasiticus* 5M43 y de *Streptomyces* C/33-6 se utilizó APD como medio de cultivo. La cepa de *Lactobacillus buchneri* BAL/7 fue sembrada en agar MRS. Se prepararon suspensiones de concentraciones  $5 \times 10^7$  conidios/ml de *A. parasiticus* 5M43 y  $5 \times 10^9$  conidios/ml de *Streptomyces* C/33-6 y de *L. buchneri* BAL/7.

Para inocular los microorganismos en los microsilos de maíz se tuvieron en cuenta los resultados observados en el ensayo preliminar “búsqueda del mejor carrier para inocular los microorganismos”. Se prepararon 48 recipientes conteniendo 20g de maíz estéril c/u a los que se les agregaron las suspensiones de los microorganismos en un volumen apropiado para alcanzar en cada microsilo  $10^7$  conidios de *A. parasiticus* 5M43/kg de maíz o  $10^9$  conidios de *Streptomyces*/kg de maíz o  $10^9$  UFC de BAL7/kg, considerando que se utilizaría un recipiente para cada microorganismo y para cada réplica del experimento.

### *Armado de los ME*

Para la confección de los ME se utilizó planta entera de maíz cosechada en estadio de grano lechoso (Fig 23 a y b). El maíz una vez picado fue mezclado y homogeneizado con el/los carriers conteniendo el/los microorganismos adecuado/s para cada uno de los tratamientos (Fig 23 c) y colocado en bolsas plásticas bicapa de iguales características a las empleadas para la confección de los silos “a campo”. El ensayo fue desarrollado en el tambo experimental dependiente de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario (Casilda). Las bolsas plásticas fueron suministradas por los Ing. Agr: Cristiano Casini y Mauricio Santajuliana de la EEA-INTA Manfredi.

a)



b)



c)



Fig 23: Confección de ME a) Maquinaria utilizada durante la cosecha y picado de la planta entera de maíz. b) Sustrato para ensilar: planta entera de maíz picada. c) Agregado del carrier previo al armado de los microsilos

Para lograr buenas condiciones de compactación el llenado de las bolsas se realizó con apisonamiento del material y disminución del aire que pudiera haber quedado retenido. Las malas condiciones se simularon no realizando la compactación y rompiendo las bolsas plásticas (Fig 24 a y b).

a)



b)



Fig 24: Microsilos experimentales de planta entera de maíz.

a) De fondo se observa la confección de un silo en tamaño Standard. b) ME dispuestos a campo

#### Evaluación de la calidad de los ME

El muestreo de los microsilos se realizó a dos tiempos: 0 (T0: previo al armado de los silos) y a los 45 días (fin del proceso de estabilización). Se tomaron alícuotas de diferentes sectores del silo con las que se prepararon submuestras de 3kg aproximadamente y de ellas se tomaron las muestras analíticas para realizar las siguientes determinaciones tendientes a evaluar la calidad de los ME:

1. Recuento total de hongos (Pitt y Hocking, 1999)
2. Recuento de *Aspergillus* grupo *flavus* (Pitt y Hocking, 1999).
3. Recuento total de BAL (de Man y col., 1960).
4. Recuento de *Streptomyces* (Korn-Wendisch y Kutzner, 1992)
5. Determinación de aflatoxinas totales (AF) (ELISA, Romers AgraQuant R Aflatoxinas Totales)
6. Determinación de DON (ELISA, Biopharm Ridascreen Fast DON R5906)
7. pH, %NH<sub>3</sub>/NT y %PB (Blain y Urtinette, 1954a,b)
8. %MS (AOAC, 1990)
9. %FDA, %FDN y %NIDA (Broderick, 1994)

#### a) Evolución de los parámetros microbiológicos

Los resultados correspondientes a las determinaciones de los parámetros microbiológicos del material a ensilar (T0) se muestra en la Tabla 21.

**Tabla 21:** Evaluación microbiológica de la materia prima utilizada en el armado de los ME (T0)

Recuentos (UFC/g) *				Toxinas (µg/kg) *	
Hongos Totales	<i>Aspergillus</i> grupo <i>flavus</i>	<i>Streptomyces</i>	BAL	AF	DON
$(3.5 \pm 1.7) \times 10^3$	< 10	< 10	$(2.6 \pm 1.2) \times 10^4$	ND	209 ± 12.7

\*expresados como promedio de 2 determinaciones ± 1 desviación standard.

ND no detectable

Los resultados correspondientes a la evaluación de los **parámetros microbiológicos** en la apertura de los ME se muestran en la Tabla 22.

**Tabla 22a:** Parámetros microbiológicos en ME conservados a campo durante 45 días con Buenas Condiciones de compactación.

TRATAMIENTOS	Recuentos (UFC/g) #				Toxinas (µg/kg) #		Evaluación Tóxico-micologica
	Hongos Totales	<i>Aspergillus</i> grupo <i>flavus</i>	<i>Streptomyces</i>	BAL	AF	DON	
<b>1B</b>	$(3.5 \pm 2.4) \times 10^3$ (*)	< 10	< 10	$(5.3 \pm 1.1) \times 10^6$	ND	230 ± 15.6	<b>A</b>
<b>2B</b>	$(3.6 \pm 0.6) \times 10^3$ (*)	< 10	< 10	$(5.9 \pm 1.6) \times 10^6$	ND	237 ± 17	<b>A</b>
<b>3B</b>	$(1.8 \pm 0.8) \times 10^2$	< 10	< 10	$(6.2 \pm 1.7) \times 10^7$	ND	215.5 ± 19.1	<b>A</b>
<b>4B</b>	$(8.1 \pm 2.7) \times 10^3$ (*)	< 10	< 10	$(6.1 \pm 1.3) \times 10^6$	ND	242.5 ± 6.4	<b>A</b>
<b>5B</b>	$(6.1 \pm 1.7) \times 10^3$ (*)	< 10	< 10	$(4.1 \pm 1.5) \times 10^6$	ND	222 ± 8.5	<b>A</b>
<b>6B</b>	$(4.2 \pm 2.9) \times 10^2$	< 10	< 10	$(3.7 \pm 1.7) \times 10^7$	ND	224.5 ± 7.8	<b>A</b>
<b>7B</b>	$(4 \pm 1.8) \times 10^2$	< 10	< 10	$(1.5 \pm 0.8) \times 10^7$	ND	228.5 ± 6.4	<b>A</b>
<b>8B</b>	$(4.7 \pm 1.5) \times 10^2$	< 10	< 10	$(2.2 \pm 1.2) \times 10^7$	ND	218.5 ± 7.8	<b>A</b>

A aceptable; Ri Riesgosa (presencia de *A. fumigatus* y/o Recuentos  $\geq 10^6$  UFC fúngicas/g y/o AF  $\geq 3\mu\text{g/Kg}$  y/o DON  $\geq 400\mu\text{g/Kg}$  y/o AF  $< 3\mu\text{g/Kg}$  y DON  $< 400\mu\text{g/Kg}$ )  
(\*) con neto predominio de levaduras

# expresados como promedio de 2 determinaciones  $\pm$  1 desviación standard.

B buenas condicione

**Tabla 22b:** Parámetros microbiológicos en ME conservados a campo durante 45 días con Malas Condiciones de compactación

TRATAMIENTOS	Recuentos (UFC/g) #				Toxinas (µg/kg) #		Evaluación Tóxico-micologica
	Hongos Totales	<i>Aspergillus grupo flavus</i>	<i>Streptomyces</i>	BAL	AF	DON	
1M	$(2 \pm 0.7) \times 10^8$	$(1 \pm 0.2) \times 10^2$	< 10	$(2.5 \pm 1.1) \times 10^5$	ND	304 ± 9.2	Ri
2M	$(5.1 \pm 1.3) \times 10^7$	$(8.1 \pm 2.1) \times 10$	$(1.3 \pm 0.5) \times 10^7$	$(1.7 \pm 0.9) \times 10^5$	ND	280.5 ± 17.7	Ri
3M	$(1 \pm 0.2) \times 10^5$	< 10	< 10	$(4.0 \pm 0.8) \times 10^6$	ND	245.5 ± 10.6	A
4M	$(8.9 \pm 1.3) \times 10^8$	$(1.3 \pm 0.6) \times 10^6$	< 10	$(1.9 \pm 0.8) \times 10^5$	ND	329 ± 12.7	Ri
5M	$(1.2 \pm 0.5) \times 10^8$	$(2.4 \pm 0.8) \times 10^5$	$(7.8 \pm 2.5) \times 10^6$	$(2.9 \pm 1.3) \times 10^5$	ND	286 ± 15.5	Ri
6M	$(6.6 \pm 1.9) \times 10^5$	$(5 \pm 2.9) \times 10^3$	< 10	$(3.7 \pm 0.4) \times 10^6$	ND	250.5 ± 10.6	A
7M	$(2.3 \pm 0.8) \times 10^5$	< 10	< 10	$(1.9 \pm 0.8) \times 10^6$	ND	256.5 ± 9.2	A
8M	$(3.9 \pm 2.3) \times 10^5$	$(7.9 \pm 2.7) \times 10^3$	< 10	$(1.4 \pm 0.7) \times 10^6$	ND	264.5 ± 14.8	A

A aceptable; Ri Riesgosa (presencia de *A. fumigatus* y/o Recuentos  $\geq 10^6$  UFC fúngicas/g y/o AF  $\geq 3\mu\text{g/Kg}$  y/o DON  $\geq 400\mu\text{g/Kg}$  y/o AF  $< 3\mu\text{g/Kg}$  y DON  $< 400\mu\text{g/Kg}$  )

(\*) con neto predominio de levaduras

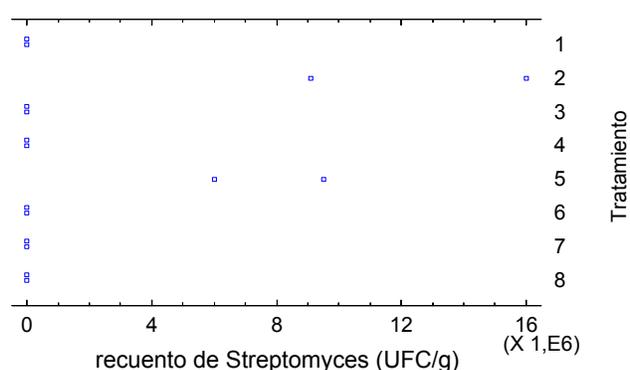
# expresados como promedio de 2 determinaciones  $\pm 1$  desviación standard.

M malas condiciones

El estudio de las variables microbiológicas (Amigot y col., 2008) se efectuó mediante un ANOVA ( $p < 0,05$ ) para un diseño factorial y posteriormente comparaciones múltiples según Tukey (Stokes y col., 2000). Los supuestos exigidos por la técnica fueron probados a través del análisis de residuos. En el caso de las variables recuento de hongos totales y concentración de DON se realizó la transformación a logaritmo natural y para recuento de BAL se utilizó la transformación raíz cuadrada.

En buenas condiciones de compactación no se detectó la **presencia de *Streptomyces*** en ninguno de los tratamientos ensayados, situación coincidente con lo esperado ya que este posible biocontrolador necesita  $O_2$  para desarrollar

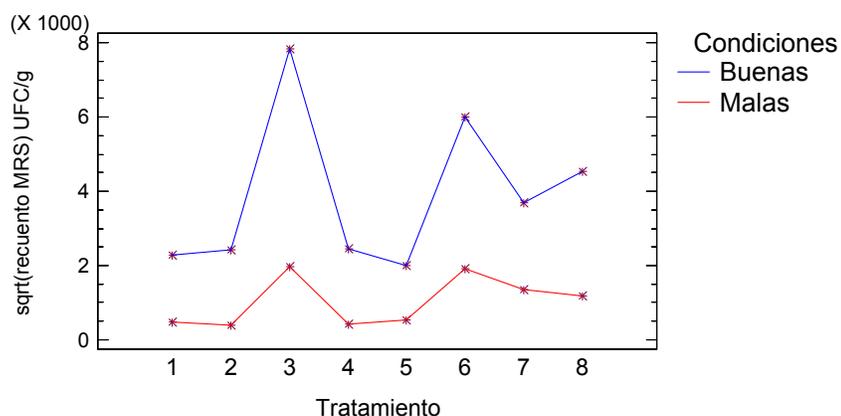
Cuando se analizaron los silos almacenados en malas condiciones (Fig 25) la presencia de *Streptomyces* sp. sólo se evidenció en los tratamientos T2 y T5. Si bien *Streptomyces* C/33-6 fue inoculado en 4 tratamientos (T2, T5, T7 y T8), su presencia fue detectada solamente en aquellos en los que no se sembró BAL/7. En los ensayos de inhibición realizados *in vitro* uno de los criterios que se tuvo en cuenta para seleccionar la cepa BAL a ser inoculada en los ME fue el de no inhibir a *Streptomyces* C/33-6. Sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos *L. buchneri* podría estar comportándose como un antagonista del *Streptomyces* C/33-6 en el ecosistema del silo.



X1,E6 = 1.000.000UFC/g

**Fig 25:** Valores observados del recuento de *Streptomyces* en malas condiciones de almacenamiento

El **recuento total de BAL** en buenas condiciones de compactación, donde se logró una apropiada anaerobiosis, fue significativamente mayor que en malas condiciones de almacenamiento, registrándose valores más altos en aquellos tratamientos donde se inoculó *L. buchneri* (T3, T6, T7 y T8) (Fig 26).



**Fig 26:** Medias de la raíz cuadrada del recuento total de BAL para los distintos tratamientos y condiciones de compactación

Las comparaciones múltiples efectuadas se resumen en la Tabla 23 que a continuación se presenta.

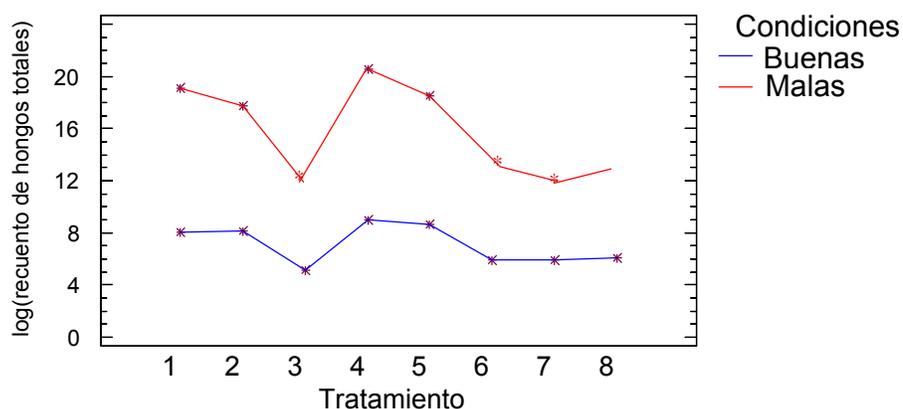
**Tabla 23:** Comparaciones múltiples según Tukey de la variable Recuento Total de BAL (raíz cuadrada) en buenas condiciones de compactación.

Buenas condiciones	
Tratamiento	Grupo homogéneo
5	a
1	a
2	a
4	a
7	b
8	b
6	b c
3	c

Letras iguales indican grupos homogéneos

En malas condiciones de almacenamiento no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos.

El **recuento de Hongos Totales** en malas condiciones resultó significativamente mayor que en buenas condiciones de compactación (Fig 27).



**Fig 27:** Medias del logaritmo del recuento total de hongos para los distintos tratamientos y condiciones de compactación

La presencia de *Streptomyces* en malas condiciones (confirmada por su recuento) disminuyó ligeramente el recuento total de hongos (principalmente en T5).

BAL/7 disminuyó las UFC/g totales tanto en buenas como en malas condiciones de compactación siendo su efecto más marcado que el de PBC1 (Tabla 24).

**Tabla 24:** Comparaciones múltiples según Tukey de la variable Recuento total de hongos en buenas y malas condiciones de compactación.

Buenas		Malas	
Tratamiento	Grupo homogéneo	Tratamiento	Grupo homogéneo
3	a	3	a
6	a	7	a b
7	a	8	a b
8	a	6	b
1	b	2	c
2	b	5	c
5	b	1	c d
4	b	4	d

En buenas condiciones de compactación las levaduras representaron aproximadamente el 60% de la flora total en aquellos tratamientos donde no se inoculó *L. buchneri* BAL/7 (Tabla 22). En los tratamientos T3, T6, T7 y T8 se observó una marcada disminución de UFC/g de levaduras atribuible a la presencia de BAL/7 (observaciones no evaluadas estadísticamente).

La inoculación del material a ensilar con BAL homofermentativas, más eficientes en el uso de la energía que las heterofermentativas, produce a partir de cada molécula de glucosa dos moléculas de ácido láctico, una mayor recuperación de materia seca y poca pérdida de energía en el ensilaje (Muck, 2002; Contreras Geneva y Muck, 2006). El ácido láctico es además un ácido fuerte que reduce más el pH en el ensilado que otros ácidos. El pH final es más alto cuando la fermentación es dominada por heterofermentadores comparado con homofermentadores. Por cada molécula de glucosa usada en heterofermentación, es producida una molécula de ácido láctico, una de ácido acético o etanol, y dióxido de carbono. El dióxido de carbono es liberado del ensilaje como un gas, resultando en pérdidas de materia seca. El ácido acético no es un ácido fuerte como el láctico, y el etanol no tiene efecto en el pH (Muck y Holmes, 2006).

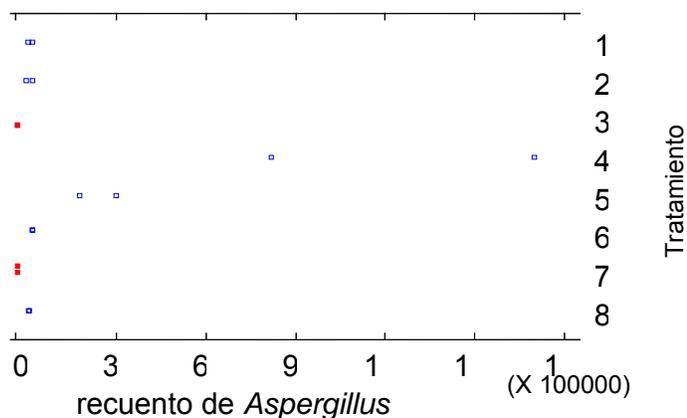
Sin embargo las bacterias heterolácticas pueden mejorar la estabilidad aeróbica de los ensilados (Ranjit y Kung, 2000). *L. buchneri* es una bacteria

heteroláctica capaz de inhibir a microorganismos como hongos (Kang y col., 2003) y levaduras (Narendranath y col., 2001) que deterioran la calidad nutricional del alimento. El uso de *L. buchneri* favorece la estabilidad aeróbica del ensilado por su capacidad de metabolizar el ácido láctico y convertirlo en ácido acético y 1,2-propanodiol bajo condiciones anaeróbicas (Oude Elferink y col., 1999a,b; Oude Elferink y col., 2001). Su eficacia ha sido anteriormente demostrada en microsilos de maíz (Ranjit y Kung, 2000) y sorgo (Filya, 2003, Kleinschmit y Kung, 2006).

Driehuis y col. (1999) también observaron que el agregado de *L. buchneri* redujo significativamente el número de levaduras, iniciadoras del deterioro aeróbico, respecto del silo control, así como la proliferación de las mismas durante la etapa de apertura del silo mejorando su estabilidad aeróbica. Iglesias y col (2004) encontraron que la inoculación de silos con *L. buchneri* disminuyó el recuento de propágulos fúngicos y el calentamiento producido durante el almacenamiento. El presente estudio coincide con lo hallado por ambos autores.

En buenas condiciones de conservación no se detectó la presencia de ***Aspergillus* sección *Flavi*** ni aún en aquellos tratamientos donde se agregó *Aspergillus parasiticus*.

Los valores obtenidos en malas condiciones de conservación se muestran en la Fig 28.



**Fig 28:** Valores observados del recuento de *Aspergillus* sección *Flavi* en malas condiciones de almacenamiento.

*L. buchneri* disminuyó significativamente los recuentos de *Aspergillus* sección *Flavi* (Tabla 25). En los tratamientos T3 y T7 no se registró desarrollo de *Aspergillus* sección *Flavi* por lo que no fueron incluidos en la Tabla.

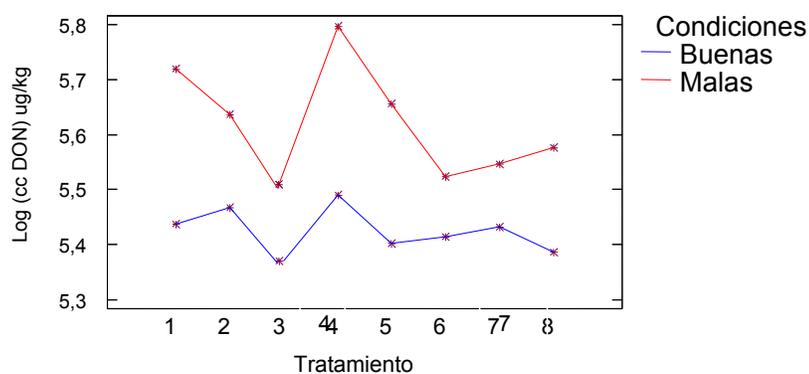
**Tabla 25:** Comparaciones múltiples según Tukey de la recuento de *Aspergillus* sección *Flavi* en malas condiciones de compactación

Malas condiciones	
Tratamiento	Grupo homogéneo
2	a
1	a
6	b
8	b
5	c
4	c

No se detectó la **presencia de AF** para ninguno de los tratamientos ni condiciones de almacenamiento evaluados en los ME.

Iglesias y col. (2004) encontraron que la inoculación de silos de maíz con *L. buchneri* disminuyó los niveles de AF.

Los **niveles de DON** fueron significativamente mayores en malas condiciones de almacenamiento (Fig 29).



**Fig 29:** Medias del logaritmo de la concentración de DON para los distintos tratamientos y condiciones de compactación

En buenas condiciones de almacenamiento no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos.

En malas condiciones el T3 presentó diferencia significativa con aquellos tratamientos donde no se inoculó BAL/7 (T2, T5, T1 y T4). Además T6, T7 y T8 difirieron significativamente de T4 (Tabla 26).

**Tabla 26:** Comparaciones múltiples según Tukey de la variable concentración de DON en malas condiciones de compactación

Malas condiciones	
Tratamiento	Grupo homogéneo
3	a
6	a b
7	a b
8	a b
2	b c
5	b c
1	b c
4	d

Si bien el recuento total de BAL fue similar para todos los tratamientos, *L.buchneri* podría ser la especie predominante en los tratamientos donde se inoculó BAL/7. Esta presencia de BAL/7 reduciría la síntesis de DON en el alimento, probablemente por inhibición de los hongos productores (*Fusarium*). Existen publicaciones en las que se reportó que cepas de *Fusarium* fueron inhibidas por el descenso de pH y la presencia de CO<sub>2</sub> producido en el proceso fermentativo de ensilados de maíz (Thrane y col., 2007).

#### b) Evolución de los parámetros químico-fermentativos

Los resultados correspondientes a las determinaciones de los parámetros químico- fermentativos del material a ensilar (T0) se detallan en la tabla 27 (Amigot y col., 2007).

**Tabla 27:** Evaluación químico-fermentativa de la materia prima utilizada en el armado de los ME (T0).

PARAMETROS QUIMICO – FERMENTATIVOS *						
pH	%NH <sub>3</sub> /NT	%MS	%PB	%NIDA/NT	%FDA	%FDN
5.63 ± 0.34	(#)	24.15 ± 0.65	10.14 ± 0.66	13.22 ± 1.80	33.61 ± 1.98	52.28 ± 2.14

\*expresados como promedio de 2 determinaciones ± 1 desviación standard.

(#) no determinado en silos sin fermentar

Los valores de los parámetros químico-fermentativos obtenidos a partir de muestras post fermentación se muestran en la Tabla 28 y en las Fig 30 a 36 (Amigot y col., 2007). Su estudio se realizó mediante un ANOVA con dos factores: las condiciones de compactación del silo bolsa a dos niveles (buenas y malas) y el tratamiento con ocho niveles (producto de todas las combinaciones posibles de los agentes de biocontrol y del hongo toxigénico). Cuando el efecto del o los factores resultó significativo se aplicaron las comparaciones múltiples de Tukey. En todos los casos se consideró un nivel de significación del 5%.

**Tabla 28a:** Parámetros químico-fermentativos de ME conservados a campo durante 45 días con Buenas condiciones de compactación.

TRATAMIENTOS	PARÁMETROS QUÍMICO – FERMENTATIVOS #							Evaluación Qco-ferm (*)
	pH	%NH <sub>3</sub> /NT	%MS	%PB	%NIDA/NT	%FDA	%FDN	
<b>1B</b>	4.43 ± 0.27	4.42 ± 0.07	18.52 ± 0.85	10.19 ± 1.05	10.35 ± 0.07	30.35 ± 1.00	54.84 ± 0.37	<b>R</b>
<b>2B</b>	4.66 ± 0.68	6.01 ± 0.01	19.99 ± 0.71	10.45 ± 0.31	11.34 ± 0.20	26.93 ± 1.34	52.24 ± 3.42	<b>R</b>
<b>3B</b>	4.84 ± 0.04	3.96 ± 0.06	22.30 ± 1.68	10.89 ± 1.54	11.85 ± 0.35	28.33 ± 3.69	56.23 ± 0.30	<b>R</b>
<b>4B</b>	4.82 ± 0.08	5.89 ± 0.01	21.28 ± 0.37	10.02 ± 0.55	12.94 ± 0.24	28.11 ± 0.92	52.61 ± 8.05	<b>R</b>
<b>5B</b>	4.66 ± 0.34	6.28 ± 0.01	22.03 ± 0.40	9.27 ± 1.48	13.12 ± 3.93	25.13 ± 1.20	54.83 ± 0.18	<b>R</b>
<b>6B</b>	4.47 ± 0.06	5.20 ± 0.17	23.66 ± 0.41	9.41 ± 0.92	14.67 ± 2.31	25.51 ± 0.49	51.59 ± 2.79	<b>R</b>
<b>7B</b>	4.57 ± 0.00	4.12 ± 0.28	20.53 ± 1.92	10.47 ± 0.07	14.56 ± 6.31	28.34 ± 0.48	54.37 ± 0.66	<b>R</b>
<b>8B</b>	4.41 ± 0.07	4.73 ± 0.38	21.57 ± 1.19	9.10 ± 0.74	12.74 ± 3.62	26.56 ± 0.17	54.40 ± 2.01	<b>R</b>

# Expresado como promedio de 2 determinaciones ± 1 desviación standard.

(\*) De acuerdo a American Society of Agronomy (1994)

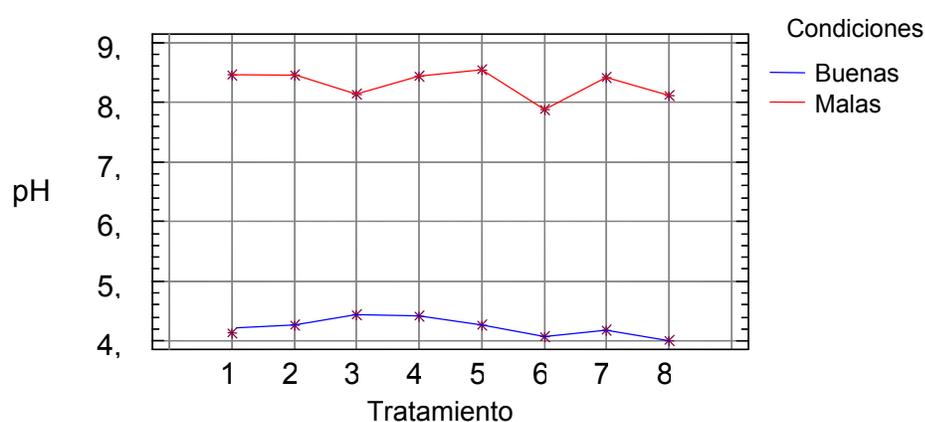
**Tabla 28b:** Parámetros químico-fermentativos de ME conservados a campo durante 45 días con Malas condiciones de compactación

TRATAMIENTOS	PARÁMETROS QUÍMICO – FERMENTATIVOS #							Evaluación Qco-ferm (*)
	pH	%NH <sub>3</sub> /NT	%MS	%PB	%NIDA/NT	%FDA	%FDN	
<b>1M</b>	8.86 ± 0.21	15.02 ± 1.02	15.96 ± 1.26	12.16 ± 1.48	19.87 ± 0.75	34.43 ± 3.24	61.46 ± 0.88	<b>M</b>
<b>2M</b>	8.87 ± 0.10	17.51 ± 0.45	15.01 ± 0.18	12.12 ± 3.15	26.50 ± 8.05	37.33 ± 3.58	66.21 ± 3.75	<b>M</b>
<b>3M</b>	8.53 ± 0.27	9.78 ± 1.09	14.49 ± 1.37	11.99 ± 0.37	20.92 ± 1.10	32.11 ± 2.96	61.37 ± 1.26	<b>R</b>
<b>4M</b>	8.84 ± 0.03	21.53 ± 0.51	14.79 ± 1.56	11.94 ± 0.93	23.59 ± 2.43	32.10 ± 1.07	62.50 ± 0.57	<b>M</b>
<b>5M</b>	8.95 ± 0.03	19.28 ± 0.04	15.82 ± 0.34	13.69 ± 0.81	19.17 ± 0.91	33.21 ± 1.15	61.71 ± 0.18	<b>M</b>
<b>6M</b>	8.28 ± 0.37	11.42 ± 1.59	17.74 ± 2.42	11.99 ± 0.11	15.22 ± 7.18	29.71 ± 0.27	59.74 ± 0.88	<b>R</b>
<b>7M</b>	8.81 ± 0.41	10.27 ± 0.16	16.79 ± 0.07	11.02 ± 0.13	19.94 ± 0.33	29.23 ± 2.47	59.15 ± 3.21	<b>R</b>
<b>8M</b>	8.52 ± 0.07	12.39 ± 1.28	15.17 ± 0.25	12.82 ± 0.31	20.28 ± 1.95	29.96 ± 1.67	59.73 ± 3.29	<b>R</b>

# Expresado como promedio de 2 determinaciones ± 1 desviación standard.

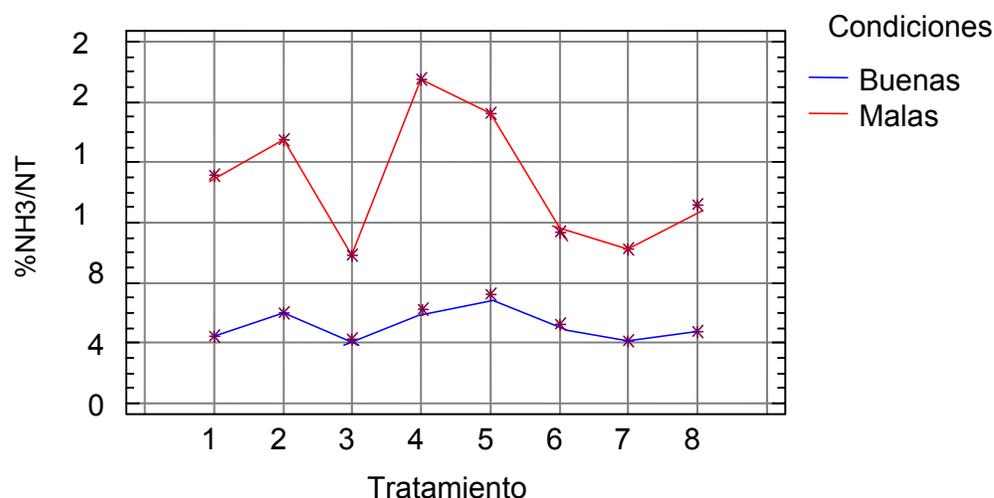
(\*) De acuerdo a American Society of Agronomy (1994)

En la Fig 30 se muestran los valores de **pH** obtenidos para cada tratamiento y para ambas condiciones de conservación estudiadas. El valor promedio de pH fue significativamente mayor en malas condiciones de compactación que en buenas para todos los tratamientos ( $p < 0.0001$ ). No se observaron diferencias significativas al analizar el pH entre los tratamientos tanto en buenas como en malas condiciones de compactación de los ME.



**Fig 30:** Valores medios de pH para los distintos tratamientos y condiciones de compactación

El valor promedio de  $\%NH_3/NT$  (Fig 31) fue significativamente mayor en malas condiciones de compactación que en buenas para todos los tratamientos, poniendo en evidencia la desaminación de las proteínas del alimento y la consecuente disminución de la calidad del ensilado.



**Fig 31:** Valores medios de %NH<sub>3</sub>/NT para los distintos tratamientos y condiciones de compactación

En buenas condiciones de compactación se registraron algunas diferencias significativas entre tratamientos para los valores de %NH<sub>3</sub>/NT. Sin embargo teniendo en cuenta estos valores y los de pH, todos los silos obtenidos pudieron ser clasificados como de calidad regular según la American Society of Agronomy (1994),

En malas condiciones, el valor promedio de %NH<sub>3</sub>/NT en los tratamientos en los que se inoculó BAL/7 (T3, T6, T7 y T8) fue significativamente menor que en el resto (Tabla 29). La presencia de BAL/7 disminuyó el %NH<sub>3</sub>/NT a valores <15, haciendo que los silos fueran calificados químico-fermentativamente como regulares y no malos (American Society of Agronomy, 1994), Estos resultados concuerdan con lo publicado por Nishino y col (2004) donde el agregado de *L. buchneri* al ensilado disminuyó la relación %NH<sub>3</sub>/NT.

La presencia de *Streptomyces* C/33-6 no mejoró el %NH<sub>3</sub>/NT de los ME en malas condiciones.

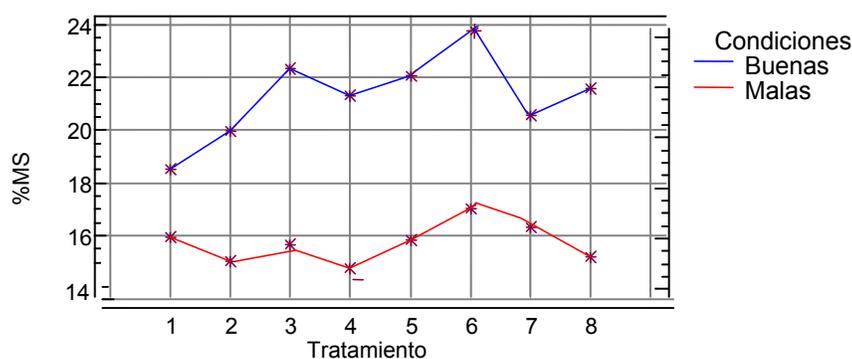
**Tabla 29:** Comparaciones múltiples según Tukey de la variable %NH<sub>3</sub>/NT en buenas y malas condiciones de compactación

Buenas		Malas	
Tratamiento	Grupo homogéneo	Tratamiento	Grupo homogéneo
3	a	3	a
7	a	7	a b
1	a	6	b c
8	a b	8	c
6	a b c	1	d
4	b c	2	e
2	b c	5	f*
5	b c	4	g

La **materia seca** (%MS) es una medida indirecta de la cantidad de agua en la que están disueltos los nutrientes del forraje. Cuando el contenido de MS en el material a ensilar supera el 25%, las pérdidas de nutrientes por efluentes y por respiración del sustrato son minimizadas. El valor óptimo de materia seca en un silo de buena calidad es de 30-35% una vez alcanzado su estabilidad post fermentación (Betancourt y col., 2006).

En los ME se observó que el valor promedio de %MS fue significativamente mayor ( $p < 0.00001$ ) en buenas condiciones de compactación que en malas para todos los tratamientos (Fig 32). Sin embargo no se alcanzaron los valores óptimos para un ensilado, probablemente debido a que el %MS de la materia prima era menor al 25%.

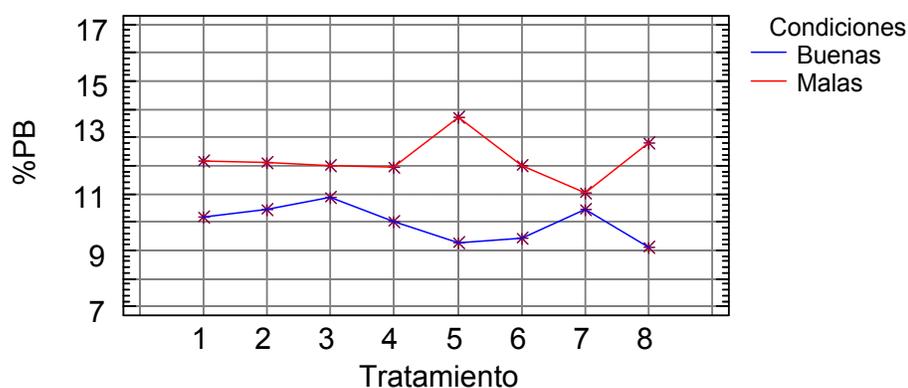
El valor promedio de %MS no difirió significativamente entre los diferentes tratamientos en ambas condiciones de compactación



**Fig 32:** Valores medios de %MS para los distintos tratamientos y condiciones de compactación

La **proteína bruta** (%PB) está definida como la fracción que incluye sustancias nitrogenadas no proteicas (NNP) como aminos, amidas, urea, nitratos, péptidos y aminoácidos aislados y proteínas verdaderas. Los valores esperados de %PB para un silo de buena calidad oscilan entre 7 y 9%.

En los ME el valor promedio de %PB fue significativamente mayor en malas condiciones de compactación que en buenas para todos los tratamientos (Fig 33).



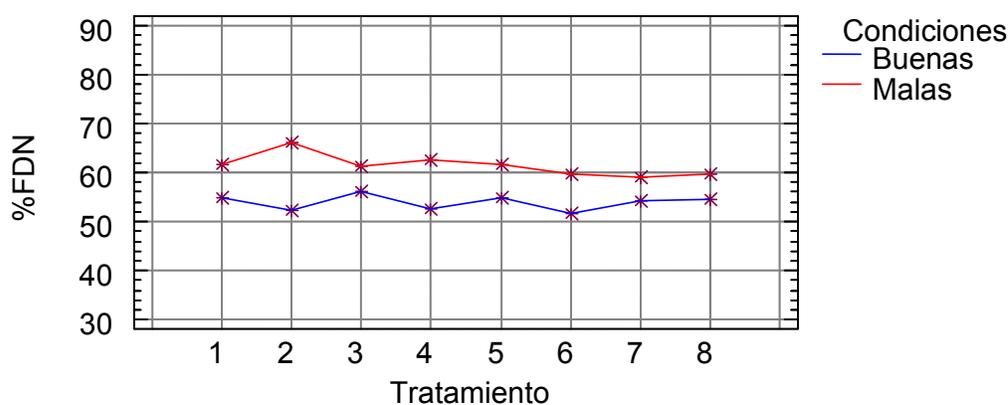
**Fig 33:** Valores medios de % PB para los distintos tratamientos y condiciones de compactación

En ambas condiciones de conservación no se registraron diferencias significativas entre tratamientos. Además los valores hallados de %PB, en casi todos los tratamientos, superaron a los deseables. Sin embargo un alto nivel de %PB no

siempre es indicativo de un buen nivel nutricional ya que los compuestos NNP, solubles o muy degradables, que pueden aumentar el %PB, poseen menor valor nutricional que las proteínas verdaderas.

La **fibra detergente neutra** (%FDN) está relacionada a la presencia de componentes de la pared celular de las plantas: hemicelulosa, celulosa, lignina, etc. EL valor esperado de %FDN es 45-55% para silos de una apropiada fermentación.

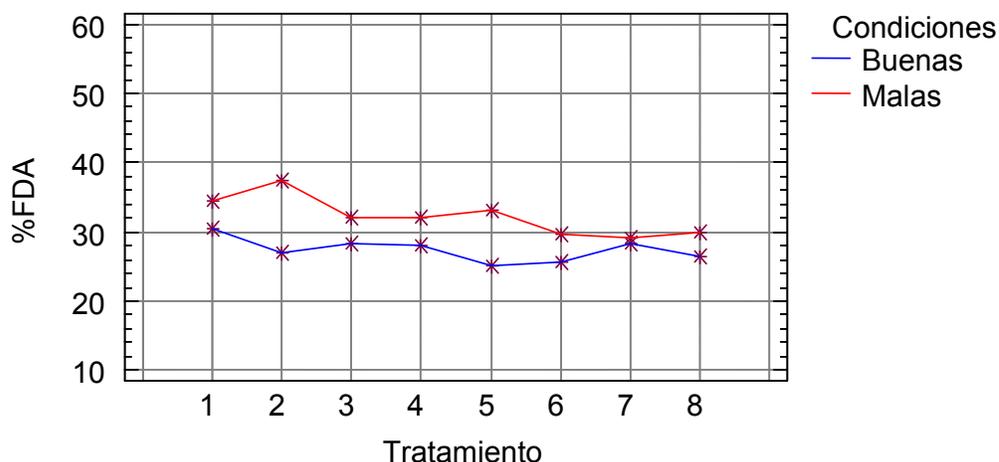
Las muestras pertenecientes a ME en buenas condiciones de conservación presentaron valores dentro del rango esperado (Fig 34). Sin embargo los silos almacenados en malas condiciones que difirieron significativamente de los buenos, sobrepasaron el límite superior del valor deseable de %FDN, sin que los PBC pudieran mejorar la situación.



**Fig 34:** Valores medios de %FDN para los distintos tratamientos y condiciones de compactación

La **fibra detergente ácida** (%FDA) estima una parte de la pared celular compuesta por celulosa ligada a lignina, además de compuestos Maillard (compuestos indigestibles producidos por sobrecalentamiento). Esta fracción es un indicador indirecto del grado de digestibilidad del forraje: cuanto más alta, menos digestible. El rango deseable de %FDA en un forraje es 27-30%.

Los ME en buenas condiciones de compactación presentaron valores deseables de %FDA (Fig 35). El valor promedio de %FDA fue significativamente mayor en malas condiciones que en buenas. En ambas condiciones no hubo efecto del tratamiento.

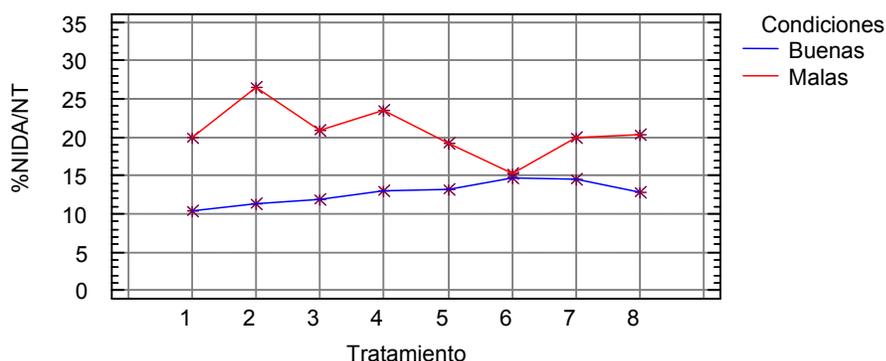


**Fig 35:** Valores medios de %FDA para los distintos tratamientos y condiciones de compactación

El **nitrógeno insoluble en detergente ácido** (%NIDA/NT) representa la proporción de proteínas no disponibles para el animal. Valores superiores al 15% indican que en el forraje se ha producido la reacción de Maillard.

En buenas condiciones los valores obtenidos de %NIDA/NT se encontraron en el rango aceptable para todos los tratamientos aplicados (Fig 36). En los ME obtenidos en malas condiciones se hallaron valores significativamente más altos.

En los tratamientos con BAL/7 (T3, T6, T7 y T8) se observó una disminución de los efectos nocivos de las malas condiciones de compactación aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas a un nivel del 5% (Fig 36).



**Fig 36:** Valores medios de %NIDA/NT para los distintos tratamientos y condiciones de conservación

Numerosas investigaciones han utilizado a *L. buchneri* como un inoculante promisorio para la confección de silos (Driehuis y col, 1999; Ranjit y Kung, 2000; Kung y Ranjit, 2001; Ranjit y col. y col; 2002; Muck y Holmes 2006; Kleinschmit y Kung, 2006). En ellos el agregado de *L. buchneri* no sólo aumentó la estabilidad aeróbica por el control que ejerció sobre la flora levaduriforme, sino que además disminuyó el sobrecalentamiento producido durante el almacenado, evitando así la pérdida de proteínas y el deterioro de la calidad nutricional del alimento (Driehuis y col, 1999; Ranjit y Kung, 2000; Kung y Ranjit 2001, Ranjit y col; 2002, Muck y Holmes, 2006; Kleinschmit y Kung, 2006). En el presente trabajo *L. buchneri* BAL/7 ejerció efecto controlador sobre el desarrollo de levaduras y mejoró la evaluación química fermentativa de los ensilados de acuerdo a American Society of Agronomy (1994).

Muy poco se ha publicado acerca de los efectos de *Streptomyces* como potencial agente de biocontrol. Hill y col (2001) hallaron que la inoculación de pasturas con *Streptomyces achromogenes* ISP 5028 previo al ensilado mejoró la calidad nutricional y química del alimento. Bressan (2003) estudiaron con buenos resultados la capacidad biocontroladora del deterioro fúngico de semillas por parte de 2 cepas de *Streptomyces* sp. Sin embargo en estos ensayos *Streptomyces* C/33-6 sólo mejoró la calidad del silo por reducción del recuento de hongos totales.

En síntesis

Las malas condiciones de conservación aumentaron significativamente pH, %NH<sub>3</sub>/NT, %PB, %FDA y %FDN, recuento total de hongos y DON y disminuyeron significativamente %MS en todos los tratamientos. BAL/7 mejoró significativamente los valores de: %NH<sub>3</sub>/NT, recuento de hongos totales, recuento de *Aspergillus* sección *flavi* y DON. El agregado de *Streptomyces* C/33-6 redujo significativamente el recuento de hongos totales. Sin embargo *L. buchneri* inhibió en los ME el desarrollo de *Streptomyces* spp.(efecto no observado *in vitro*) por lo que ambos PBC no podrían inocularse simultáneamente.

### Evaluación de aceptabilidad de los ME

Analizando los parámetros químico-fermentativos (Tabla 28) los ME almacenados en buenas condiciones fueron clasificados como de calidad regular. De acuerdo al algoritmo de trabajo propuesto para determinar la calidad final de ensilados de maíz (Fig 18), cuando la evaluación químico-fermentativa es MB, B o R, sólo sería necesario determinar AF y DON. Teniendo en cuenta dicho protocolo y los valores registrados en Tabla 22, los ME producidos en buenas condiciones de compactación resultaron aceptables para el consumo en todos los tratamientos evaluados (Tabla 30a).

**Tabla 30a:** Evaluación final de la calidad de ME con Buenas condiciones de compactación

Muestras	Evaluación Químico-fermentativa (1)	Evaluación Toxico-micológica (2)	Evaluación Final (3)
<b>1B</b>	R	A	<b>A</b>
<b>2B</b>	R	A	<b>A</b>
<b>3B</b>	R	A	<b>A</b>
<b>4B</b>	R	A	<b>A</b>
<b>5B</b>	R	A	<b>A</b>
<b>6B</b>	R	A	<b>A</b>
<b>7B</b>	R	A	<b>A</b>
<b>8B</b>	R	A	<b>A</b>

MB: Muy Buena, B: Buena, R: Regular, M: Mala, A: Aceptable, Ri: Riesgosa:

(1) De acuerdo a pH y %NH<sub>3</sub>/NT de Tabla 28

(2) De acuerdo a AF y DON de Tabla 22

(3) A: Si (1) es B o MB o R y (2) es A

Ri: Si (1) es M, o si (1) es R y (2) Ri

**Z**

**Tabla 30b:** Evaluación final de la calidad de ME con Malas condiciones de compactación

<b>Muestras</b>	<b>Evaluación Químico-fermentativa (1)</b>	<b>Evaluación Toxico-micológica (2)</b>	<b>Evaluación Final (3)</b>
<b>1M</b>	M	A	<b>Ri</b>
<b>2M</b>	M	A	<b>Ri</b>
<b>3M</b>	R	A	<b>A</b>
<b>4M</b>	M	A	<b>Ri</b>
<b>5M</b>	M	A	<b>Ri</b>
<b>6M</b>	R	A	<b>A</b>
<b>7M</b>	R	A	<b>A</b>
<b>8M</b>	R	A	<b>A</b>

MB: Muy Buena, B: Buena, R: Regular, M: Mala, A: Aceptable, Ri: Riesgosa:

(1) De acuerdo a pH y %NH<sub>3</sub> /NT de Tabla 28

(2) De acuerdo a AF y DON de Tabla 22

(3) A: Si (1) es B o MB o R y (2) es A

Ri: Si (1) es M, o si (1) es R y (2) Ri

En malas condiciones los tratamientos T1, T2, T4 y T5 produjeron forrajes químico-fermentativamente malos, y por lo tanto considerados riesgosos para el consumo animal aunque su evaluación tóxico-micológica haya resultado aceptable. En cambio en aquellos tratamientos donde se inoculó BAL/7 la calidad químico-fermentativa fue Regular y considerando los resultados de AF y DON, la evaluación final de tales ensilados resultó aceptable.

#### En síntesis

Las condiciones experimentales no permitieron obtener silos de Buena calidad. En Buenas condiciones de conservación los ME resultaron de calidad Regular. Las Malas condiciones produjeron silos de calidad químico-fermentativa Mala a excepción de aquellos en los que fue inoculado BAL/7, calificados como Regulares. Todos los ME Regulares fueron Aceptables en su evaluación final.

La aceptabilidad final de los ME obtenida a partir del análisis conjunto de todas los parámetros coincidió con la resultante del empleo de las variables indicadoras.

*Conclusiones*

## EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS ALMACENADOS DESTINADOS AL CONSUMO ANIMAL

El análisis de los parámetros químico-fermentativos de los ensilados destinados al consumo animal permitió calificar a las muestras de sorgo y maíz mayoritariamente como de calidad regular. Las muestras de alfalfa fueron clasificadas como regulares y malas, casi en igual proporción.

Cuando se analizó la asociación entre la calidad químico-fermentativa y la metodología utilizada para su conservación se observó que el sistema puente no era recomendable para el almacenamiento de sorgo. No existió asociación significativa entre el sistema de conservación y la calidad químico-fermentativa cuando maíz o alfalfa fueron usados como matriz de los forrajes.

Teniendo en cuenta el recuento total de hongos, los ensilados de maíz fueron los más contaminados seguidos por los de alfalfa debido tal vez a una menor disponibilidad de azúcares fermentescibles. Los silos de sorgo presentaron la menor frecuencia de muestras contaminadas (recuentos  $\geq 10^6$  UFC/g), probablemente por el efecto protector al ataque fúngico brindado por los taninos que ellos contienen.

Los hongos levaduriformes fueron los de mayor aparición en los forrajes, consumiendo el ácido láctico, provocando así un aumento de pH en el ensilado y favoreciendo la proliferación de mohos y el deterioro aeróbico del alimento. Entre los hongos filamentosos los posibles toxigénicos fueron los más aislados. Dentro de ellos el género *Aspergillus* fue el que se presentó mayoritariamente en los 3 sustratos siendo *Aspergillus* sección *flavi* los más frecuentes independientemente del sistema de conservación empleado.

Alfalfa resultó un sustrato no susceptible a la colonización por *A. fumigatus*, importante patógeno humano y animal. En sorgo se detectó su presencia en mayor proporción que en maíz, en ambos sustratos en muestras con alto contenido de humedad.

Cuando se evaluó la toxigenicidad de los aislados se comprobó la capacidad productora de AF por 2 cepas de *Aspergillus* y de fumonisinas por 2 cepas del género *Fusarium*. No se encontraron cepas productoras de tricotecenos. Si bien el número de hongos con capacidad toxigénica probada *in vitro* no fue tan elevado, su presencia en los silos representa un factor de

riesgo potencial para la salud humana y animal. El daño que estos hongos pueden producir en la calidad nutritiva de los alimentos se ve incrementado por la posibilidad de la producción de niveles inaceptables de micotoxinas.

Los ensilados base alfalfa y maíz presentaron la mayor incidencia de micotoxinas con valores no aceptables para el consumo animal. En estos sustratos se presentaron mayoritariamente en forma conjunta las dos toxinas evaluadas. Los valores más altos de DON se presentaron en forrajes base maíz y alfalfa. En los ensilados de sorgo se encontraron las concentraciones más altas de AF.

## **PARÁMETROS DECISIVOS PARA EVALUAR LA CALIDAD DE LOS FORRAJES. BÚSQUEDA DE VARIABLES INDICADORAS DE LA CALIDAD**

El alto porcentaje de muestras de calidad químico-fermentativa Regular mostró la necesidad de analizar otros parámetros (tóxico-micológicos) que permitieran tomar una decisión con respecto a la aceptabilidad de un forraje para su uso en la alimentación animal. En base a la evaluación conjunta de las todas las variables estudiadas se pudo concluir que en muchos casos los parámetros químico-fermentativos o toxico-micológicos *per se* resultaron insuficientes para obtener la calificación final de los forrajes.

Las muestras de calidad Mala deben ser rechazadas por su deficiente aporte nutricional independientemente de su evaluación toxico-micológica.

En el caso de las muestras de sorgo y alfalfa que fueron clasificadas químico-fermentativamente como de calidad Muy Buena o Buena no es necesario realizar otra determinación. Sin embargo para los alimentos de maíz químicamente calificados como Muy Buenos o Buenos sí resultaría indispensable el análisis de los parámetros toxico-micológicos.

Para conocer la aceptabilidad de las muestras de forrajes de maíz o alfalfa con calidad químico fermentativa Regular, sólo es necesario analizar AF y DON (variables indicadoras). En el caso de las muestras de sorgo hay que determinar el recuento de hongos totales, la presencia de *A. fumigatus* y la concentración de AF.

En base al análisis de los parámetros químico-fermentativos y tóxico-micológicos o de sus variables indicadoras la mayoría de las muestras de alfalfa y maíz no resultaron Aceptables para el consumo de ganado vacuno, mientras que casi la mitad de los forrajes de sorgo resultaron también Riesgosos.

### **CONTROL BIOLÓGICO DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA *in vitro***

En la búsqueda de potenciales biocontroladores de hongos toxigénicos fue seleccionada una cepa de *Streptomyces* sp., C/33-6, por presentar una fuerte actividad antagonista *in vitro*.

También se ensayó la capacidad biocontroladora de hongos toxigénicos por cepas de BAL, seleccionando a *Lactobacillus buchneri*, BAL/7, que presentó una fuerte inhibición frente a todas las cepas de hongos ensayadas y no inhibió a *Streptomyces* sp. C/33-6 *in vitro*.

Se seleccionó como hongo toxigénico a controlar una cepa de *A. parasiticus*, 5M43, por presentar una alta capacidad para producir conidios en medios y condiciones sencillas y por ser un productor de aflatoxinas más probable que *A. flavus*.

El maíz resultó mejor vehículo para inocular los microorganismos en el armado de los ME.

### **CONTROL BIOLÓGICO DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA DE FORRAJES EN ME**

El diseño experimental propuesto permitió obtener buenas y malas condiciones de almacenamiento.

Las malas condiciones de conservación aumentaron significativamente pH, %NH<sub>3</sub>/NT, %PB, %FDA y %FDN, recuento total de hongos y DON y disminuyeron %MS en todos los tratamientos. BAL/7 mejoró significativamente los valores de: %NH<sub>3</sub>/NT, recuento de hongos totales, recuento de *Aspergillus* sección *flavi* y DON. El agregado de *Streptomyces* C/33-6 redujo el recuento de

hongos totales. Sin embargo *L. buchneri* inhibió en los ME el desarrollo de *Streptomyces* spp. (efecto no observado *in vitro*) por lo que ambos Potenciales Biocontroladores no podrían inocularse simultáneamente.

Las condiciones experimentales no permitieron obtener silos de Buena calidad químico-fermentativa. En buenas condiciones de conservación los ME resultaron de calidad Regular. Las malas condiciones produjeron silos de calidad químico-fermentativa Mala a excepción de aquellos en los que fue inoculado BAL/7, calificados como Regulares. Todos los ME Regulares fueron Aceptables en su evaluación final.

La aceptabilidad final de los ME obtenida a partir del análisis conjunto de todas los parámetros coincidió con la resultante del empleo de las variables indicadoras.

En las condiciones ensayadas *Lactobacillus buchneri* BAL/7 resultó un agente de biocontrol más promisorio que *Streptomyces* sp C/33-6.

*Bibliografia*

- Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castella, G.; Accensi, F. y Cabañes, F.J. (1997). New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *J. Food Protec.* 60: 1580–1582.
- Abarca, M.L.; Accensi, F.; Cano J. y Cabañes, F.J. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *A. van Leeuwenhoek* 86: 33–49.
- Acosta, M.G. (2005). Estudios iniciales de proteínas antifúngicas por distintas especies de *Streptomyces*. Tesina para optar por título de Licenciado en Biotecnología Fac Cs Bioquim y Farm. UNR.Rosario. Argentina.
- Adesogan, T. (2003). Mycotoxins in ensiled forages. Available on line: <http://www.qualitysilage.com/PDF/MycotoxinsMoldArticle.pdf>
- Adhikari, A.; Sen, M.; Gupta-Bhattacharya, S. y Chanda, S. (2004). Airborne viable, non-viable, and allergenic fungi in a rural agricultural area of India: 2 year study at five outdoor sampling stations. *Sci. Total Environ.* 326: 123-141.
- Akande, K.E.; Abubakar, M.M.; Adegbola, T.A. y Bogoro, S.E. (2006). Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: a review. *Pak. J. Nutrit.* 5 (5), 398-403
- Alexander, B y Pfaller, M. (2006). Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin. Inf.Dis.* 43:S15-27. Supplement article
- American Society of Agronomy (1994). American Society of Agronomy, Inc.- Soil Science Society of America, Inc. – Madison, Wisconsin. USA. 1994.
- Amigot, S.; Caffaratti, S.; Aringoli, E.; Fulgueira, C. y Basílico, J. (2001a). Evaluación tóxica – micológica de silos de sorgo en relación a sus características fermentativas”. IX Cong. Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina (07 al 11/10/01).
- Amigot, S., Basílico, M.L.Z.; Bottai, H.; Leiva, M.; Fulgueira, C. (2001b). Cepas de *Streptomyces* como potenciales biocontroladores de hongos toxigénicos aislados de forrajes conservados” IX Cong.Argentino de Microbiología. Buenos Aires, argentina (07- 11/10/01).
- Amigot, S.; Fulgueira, C.; Basílico, M.Z.; y Basílico, J. C. (2002) Micoflora y presencia de aflatoxinas y deoxinivalenol en forrajes conservados para consumo animal. IX Cong. Argentino de Micología y XIX Jor. Argentinas de Micología. Chaco. Argentina. (7-9/06/02)
- Amigot, S.L.; Caffaratti, S.; Bottai, H.; Basílico, M.L.Z.; Fulgueira, C.L.; Basílico, J.C. (2003) Búsqueda de nuevos parámetros para evaluar la calidad de forrajes. In: *Proceedings of the 11nd Argentine Congress of Food Microbiology*, Santa Fe, Argentina, 69 pp
- Amigot, S.L.; Caffaratti, S.; Fulgueira, C.L.; Bottai, H.; Ivancovich, J.J.; Basílico J.C. (2004) Quality of forage crops for animal feeds. *BioCell* 27(2): 247.
- Amigot, S.L.; Caffaratti, S.; Fulgueira, C.L.; Bottai, H.; Leiva, M. y Basílico, J.C. (2005a). Calidad de ensilados para consumo de ganado”. Publicado en Libro de Res. I Jornadas de Ciencia y Tec. de los Alimentos. (Rosario, Argentina, 20/10/2005).
- Amigot, S.L.; Basílico, M.L.Z.; Bottai, H.; Fulgueira, C.L.; Basílico, J.C. (2005b) Biocontrol de hongos toxigénicos aislados de forrajes” Publicado en Libro de Res. I Jornadas de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. (Rosario, Argentina, 20/10/2005)
- Amigot, S.L.; Basílico, J.C.; Bottai, H.; Basílico, M.L.Z. y Fulgueira, C.L. (2005c). Estrategias para mejorar la calidad de forrajes. In: *Proceedings of the Xth Argentine Congress of Micology*, Buenos Aires, Argentina, 125.
- Amigot S.L, Fulgueira C.L y Basílico J.C. (2006) New parameters to evaluate forage quality. *Posth. Biol. Tech.* 41: 215-224.
- Amigot, S.; Gaggiotti, M.; Romero, L., Bottai, H.; Leiva M.; D'esposito, R.; Basílico, J.C. y Fulgueira, C. (2007). Efecto de potenciales agentes de biocontrol sobre los parámetros químico fermentativos de microsilos experimentales. Pub de resúmenes: IX Cong. y XXVII Reunión anual de la Soc. de Biol. Rosario, Argentina. 3-5/12/2007.

- Amigot, S.; Fulgueira, C.; Bottai, H.; Leiva, M.; D'Esposito, R.; Gaggiotti, M.; Romero, L.; Vinderola, C.; y Basílico, J.C. (2008) Evaluación de la calidad de microsilos de maíz inoculados con potenciales biocontroladores Libro de resúmenes: IX Cong. y XXVII Reunión anual de la Soc. de Biol. Rosario, Argentina. 3-5/12/2007.
- Anderson, A.S, y. Wellington, E.M.H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:797–814.
- AOAC. (1990). Moisture in Animal Feed. Official methods of analysis, 15<sup>th</sup> Edition, Vol. I:69.
- Aspergillus* Web Site (2007): List all secondary metabolites by species List mycotoxins only. Available online: <http://www.aspergillus.org.uk/secure/metabolite>.
- Auerbach, H; Oldenburg, E. y Weissbach, F.(1998). Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silage. *J.Sci. Food Agric.* 76:565-572.
- Auerbach H. (2003). Mould growth and mycotoxin contamination of silage: source, types and solutions. Available online: [http://www.engormix.com.mould\\_growth\\_and\\_mycotoxin\\_e\\_articles\\_219](http://www.engormix.com.mould_growth_and_mycotoxin_e_articles_219).
- Axelsson, L. (1998) Lactic acid bacteria Classification and physiology En Salminein S and Von Wright S. Lactic acid bacteria. Microbil. and functional aspects. Seg ed. Marcel Dekker, Inc 617.
- Bu'lock, D.D. y Chulze de Gómez, S. (1990). Effect of a regulatory mutation on trichothecene production by *Fusarium graminearum* strain NRRL 3198. *Mycol. Res.* 94(6): 851-864.
- Badosa, E.; Ferre, R.; Monroc, S.; Besalú, E.; Planas, M.; Feliu, I.; Bardají, E.; Montesinos, E. (2006). Diseño, síntesis y mejora de péptidos antimicrobianos para el control de bacterias fitopatógenas. 2006. XIII Cong. Soc. Española de Fitopatología. Murcia
- Balajee, S.A.; Houbraken, J.; Verweij, P.E.; Hong, S-B.; Yaghuchi, T.; Varga, J. y Samson, R.A. (2007). *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud. in Mycol.* 59: 39–46.
- Basílico, M.L; Rica, A.P.; Pantanali, R.A. y Basílico, J.C. (1996). Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de diacetoxiscirpenol. *Rev. Arg. Microbiología* 19: 4-8.
- Bhat, R.V. y Vasanthi, S. (2003) Food safety in food security and food trade. Available online: <http://www.ifpri.org/2020/focus/focus10.htm>
- Beltzer, M.P. (2003). Estudios de *Byssochlamys nivea* en ensilados de alfalfa y potencialidad de los mismos para la producción de patulina en microsilos experimentales. Tesis Doctoral. U.N.L., Argentina
- Benítez, T.; Delgado-Jarana, J.; Rincón, A.; Rey, M. y Limón, M.C. (1998). Biofungicidas: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (Ed.) *Recent Res Develop. Microbiology.* India, Res. Signpost.; 2: 129-150.
- Berek, L; Petri, I.; Mestreházy, A., Téren, J. y Molnár, J. (2001). Effects of mycotoxins on human immune functions in Vitro. *Toxicol. in vitro.* 15:25-30.
- Bertoia, L. (2007). Algunos conceptos sobre ensilaje. Available online: [http://64.76.120.161/algunos\\_conceptos\\_sobre\\_ensilaje\\_s\\_articulos\\_1716\\_AGR.htm](http://64.76.120.161/algunos_conceptos_sobre_ensilaje_s_articulos_1716_AGR.htm).
- Betancourt, M.; González, I y Martínez de Acurero, M. (2006). Evaluación de la calidad de los Forrajes. Available online: [http://www.engormix.com/evaluacion\\_calidad\\_forrajes\\_.htm](http://www.engormix.com/evaluacion_calidad_forrajes_.htm)
- Blain, J.M. y Urtinette, M.A. (1954a). Determinación de L'anmoniaque Method. Interpretation des resultats. Conference Europeiene des Herbages. París: 317-323
- Blain, J.M. y Urtinette, M.A. (1954b). Le pH des ensilages. Conference Europeiene des Herbages. París: 311-31.
- Bolsen, K.K. (1998). Forage facts. Improving silage quality. Available online: [http://www.oznet.k-estate.edu/pr\\_forage/pubs/97notebook/fora06/pdf](http://www.oznet.k-estate.edu/pr_forage/pubs/97notebook/fora06/pdf)

- Bonaterrea, A.; Mari, M.; Casalini, L. y Montesinos, E. (2003). Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *Int. J. Food Microbiol.* 84:93-104.
- Borghi, A.L.; Fulgueira, C.L. y Bracalenti, B.J.C. de. (1988). Inhibición de *Fusarium graminearum* por una cepa de *Streptomyces* spp. *Bol. Micol.* 4(1): 237-242.
- Borghi, A.L.; Fulgueira, C.L.; y Bracalenti, B.J.C. de. (1992). Antagonism between toxigenic fungi and a strain of *Streptomyces* spp. *Rev. Microbiol.* 23(3): 194-198.
- Bormann, C.; Baier, D.; Hörr, I.; Raps, C.; Berger, J.; Jung, G. y Schwarz, H. (1999). Characterización of a novel antifungal chitin binding protein from *Streptomyces tendae* Tü901 That interferes with growth polarity. *J. Bacteriology.* 181(24) 7421-7429
- Bottalico, A.; Lerario, P. y Visconti, A. (1983). Productions of mycotoxins (zearalenone, trichothecene and moniliformin) by *Fusarium* species in Italy. *Microb. Alim. Nutr.* 1:133-142.
- Bottazzi, V. (1988). An introduction to rod shaped bacteria. *Biochimie* 70:303–315
- Bottone, E. y Peluso, R. (2003). Productions by *Bacillus pumilis* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminar report. *J. Med. Microbiol.* 52: 69-74.
- Bowyer, P. (1999). Plant disease caused by fungi: phytopathogenicity In: *Molecular Fungal Biology*, (RP Oliver, M Schweizer), University Press, Cambridge.
- Breitholtz-Emanuelsson, A.; Olsen, M.; Oskarsson, A.; Palminger, I; y Hult K. (1993) Ochratoxin A in Cow's milk and in Human milk with corresponding human blood samples. *J. AOAC Intern.* 76: 842-846.
- Bressan, W. (2003) Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of Actinomycetes. *Biocontrol*, 48, 233-240.
- Bressan, W. y Fontes Figueiredo, J.E. (2008). Efficacy and dose–response relationship in biocontrol of *Fusarium* disease in maize by *Streptomyces* spp. *Europ. J. P. Path.* 120:311–316
- Broderick, G. A. (1994). Quantifying forage protein quality. Section II: Identification and quantitative measurement of forage quality components. In *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*. George C. Fahey, Jr. Editor: 200-228.
- Bruno, O.A.; León, R.J.; Romero, L.A. y Quaino, R.O. (1998). Varieties evaluation of lucerne (*Medicago sativa*) with different winter dormancy class. In: *Proceedings of the XVI International Congress, Nice, France*, 463-464.
- Buckle, A. (1983). The occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs. *Vet. Res. Commun.* 7:171-186.
- Cabrifiga Olamendi, J. (2005). Fire blight (*Erwinia amylovora*) of rosaceous plants, pathogen virulence and selection and characterization of biological control agent. Doctoral thesis. Univ. Girona.
- Cai, Y.; Benno, Y.; Ogawa, M. y Kuma, S. (1999). Effect of Applying Lactic Acid Bacteria Isolated from Forage Crops on Fermentation Characteristics and Aerobic Deterioration of Silage. *J. Dairy Sci.*, 82: 520-526.
- Campbell, R. (1989). *Biological control of microbial plant pathogens*. Cambridge University Press. Cambridge 218.
- Castillo, M.D.; Gonzalez, H.H.L.; Martinez, E.J.; Pacin, A.M. y Resnik, S.L. (2004). Mycoflora and potential production of freshly harvested black bean the grains and fungal spores brought by wind would fall from the Argentinean main production area. *Mycopath.* 158: 107-112.
- CDC. (2006). Food illnesses decline. CDC reports Center for Disease Control and preventions (CDC). Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Listeriosis. By Marilyn Marchione ap

- medical writer. Available online: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml> - <http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/>
- Chang, W.T.; Chen, C.S. y Wang, S.L. (2003). An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Curr. Microbiol.* 47:102-108.
- Cherney, J.H. (2000). Forage quality in perspective. Available online: <http://www.forages.psu.edu/agfacts/agfact30.pdf>.
- Chet, I.; Ibar, J. y Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT & Söderström B (Eds.) *The Mycota IV: Env. and microbial relationships*, New York, Springer Verlag, 165-192.
- Cisneros, F. (1995). Control biologic. [http://www.avocadosource.com/books/CisnerosFausto1995/CPA\\_8\\_PG\\_102-147.pdf](http://www.avocadosource.com/books/CisnerosFausto1995/CPA_8_PG_102-147.pdf)
- Clifford J. G. y Cook, R. J. (1990) *Biological Control: The Need for a New Scientific Framework* BioScience, 40(3) 204-206 Published by: American Institute of Biological Sciences.
- Coelho, R.R.R.; Lopes, A.; de Azevedo Soares Semedo, L.T. y Steele da Cruz, F. (1995). Culture filtrates of *Actinomyces* isolated from tropical soils inhibit *Trypanosoma cruzi* replication *in vitro*. *Rev. Microbiol.* 26(4): 307-313.
- Cole, R.J. (1976). Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from silage. International Symposium on Mycotoxins, Paris.
- Cole, R.J.; Kirksey, J.W.; Dorner, J.W.; Wilson, D.M.; Johnson, J.C.; Johnson, A.N.; Bedell, D.M.; Springer, J.P.; Chexal, K.K.; Clardy J.C. y Cox. R.H. (1977). Mycotoxins produced by *Aspergillus* species isolated from moulded silage. *J. Agric. Food Chem.* 25:826-830.
- Colombatto, D. (2000) Análisis de alimentos. Aplicaciones prácticas. Available online: [http://www.agro.uba.ar/catedras/p\\_lechera/resumencolombatto.pdf](http://www.agro.uba.ar/catedras/p_lechera/resumencolombatto.pdf)
- Contreras-Govea, F. y Muck, R. (2006). Inoculantes Microbiales para ensilaje Agricultural Ensilar University of Wisconsin Board of Regents. Focus on forage. Available online: <http://www.uwex.edu/ces/crops/teamforage>.
- Cotty, P.J. (2006). Biocompetitive exclusion of toxigenic fungi. In: *The mycotoxin factbook: food and feed topics*. Barug D, Bhatnagar D, van Egmond HP, van der Kamp JW, van Osenbruggen WA, Visconti A, eds. Wageningen: Wageningen Acad. Publish.:179 -197.
- Coulombe, R. A., Jr. (1994). Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B1, p. 89-110. In D. L. Eaton, and J. D. Groopman (ed.), *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST). (2003). *Mycotoxins Risks in Plant, Animal, and Human Systems* Ames, Iowa, USA, 199 pp.
- Cowan, T. (2001). Uso de forrajes ensilados en sistemas de producción animal en gran escala. Available online: <http://www.fao.org/docrep/005/X8486S/x8486s05.htm>.
- D'Mello, J.P.F. (2002) *Microbiology of Animal Feeds*. Available online: [http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/556\\_EN.HTM](http://www.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/556_EN.HTM)
- da Silva, J.; Pozzi, C.; Mallozzi, M.; Ortega, E. y Correa, B. (2000). Mycoflora and occurrence of aflatoxins B1 during storage of Brazilian sorghum. *J. Agric. Food. Chem.* 48 (9): 4352-4356.
- Dairy Business Communications. A multi Ag media Company. (2004). Mycotoxins hurt production and health. Available online: <http://www.dairybusiness.com/western/TWDFeatures.htm>.
- De Lucca, A. (2007). Harmful fungi in both Agriculture and Medicine. *Rev. Iberoam. Micol.* 24:3-13.
- de Man, J.C.; Rogosa, M. y Sharp, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. App. Bacteriol.* 23, 130-135.

- Dagenais, T.; y Keller, P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2(3): 447–465.
- Demarquilly, C (1998). Ensilage et contamination du lait par les spores butyriques. *Prod. animals*. 11(5): 359-364
- Denli, M. y Perez, J.F. (2006). Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamientos y prevención. En XXII curso de especialización FEDNA- Barcelona. Available online: [http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/06CAP\\_I.pdf](http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/06CAP_I.pdf).
- Di Costanzo, A.; Johnston, L.; Windels, H. y Murphy, M. (1995). A review of the effects of molds and mycotoxins in ruminants. *Prof. Animal Sc.* 12:138-150.
- Díaz, G. (2005). Micotoxinas y micotoxicosis de importancia en salud humana en Colombia. Memorias IX Congreso Nacional de Avicultura. Federación Nacional de Avicultura. Caracas, 11 – 14/05/05.
- Díaz, S. ; Domínguez, L. ; Pieta, J. ; Blanco, J. y Moreno, M. (1995). Application of biphasic dialysis membrane procedure for surveying occurrence of aflatoxin M1, in commercial milk. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2678-2680.
- Dicklow, M.B.; Acosta, N. y Zuckerman, B.M. (1993). A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. *J. Chem. Ecol.* 19(2):159-173.
- Driehuis, F. y van Wijkelaar, P.G. (1996). Effects of addition of formic, acetic or propionic acid to maize silage and low dry matter grass silage on the microbial flora and aerobic stability. Available online: <http://www.fao.org/docrep/005/x8486s/x8486s04.htm>
- Driehuis, F.; Oude Elferink, S.J.W.H. y Spoelstra, S.F. (1999) Anaerobic lactic acid degradation in maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J. Appl. Microbiol.* 87: 583-594.
- Driehuis, F. y Oude Elferink, S.J.W.H. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet. Quart.* 22(4): 212-217.
- Driehuis, F.; Spanjerb, M.C.; Scholtenb, J.M. y Te Giffela, M.C. (2008) Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands *Food Addit. and Contamin.:* Part B 1(1) 41–50.
- Droby, S; Chalutz, E y Wilson, C. (1991) Antaginst microorganisms as biological control agents of post harvest diseases of fruit and vegetables. *Post harv. news inform.* 2:169-173.
- Durán Accino, V.E. y Cazorla López F.M. (1996). Perspectivas del control biológico de enfermedades en plantas. *Enc en la Biología*, N°. 35.
- Dutkiewicz, J.; Olenchock, S.A.; Sorenson, W.G.; Gerencser, V.F; May, J.J.; Pratt, D.S. y Robinson, V.A. (1989). Levels of bacteria, fungi and endotoxin in bulk and aerosolized corn silage. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(5):1093-1099.
- El-Shanawany, A.; Eman Mostaza, M. y Barakat, A. (2005) Fungal populations and mycotoxins in silage in Assuit and Sohag govermentes in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergilli* toxins. *Mycopat.* 59 : 281-289.
- Ellis, M. (1971). *Demateaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Instituto, Kew, Surrey, England.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones (2003). Available online: [http://www.fao.org/es/ESN/index\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/index_en.stm)
- Fernandez Meyer, A. (1999). El silaje y los procesos fermentativos En: Silaje de planta entera, Cap. I: 4-11.EEA INTA Bordenave. Available online: [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_reservas/reservas\\_silos/01-el\\_silaje\\_y\\_los\\_procesos\\_fermentativos.htm](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/01-el_silaje_y_los_procesos_fermentativos.htm)

- Ferret, A. (2003). Control de calidad de forrajes. Available online: [http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/03CAP\\_VII.pdf](http://www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/03CAP_VII.pdf)
- Feutch, W. y Treutter, D. (1999). The role of flavan 3-ols and proanthocyanidins in plant defense. Principles and practices in plant Ecology. Edited by CRS Press. Washington. D.C. USA. Cap 19. 307-338pp.
- Filya, I. (2003) The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *J Appl Microbiol.* 95(5):1080-6.
- Forsberg, N. y Wang, Y. (2006). Nutrición e Inmunidad en Vacas Lecheras: Implicaciones a Síndrome Hemorrágico del Intestino. Available online: <http://www.omnigenresearch.com/pdf/nutricion.pdf>
- Frances, J.; Bonaterra, A.; Moreno, M.C.; Cabrefiga, J.; Badosa, E. y Montesinos, E. (2006) Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Posth. Biol. Tech.* 39 (3): 299–307.
- Franciosa, G.; Pourshaban. M.; Gianfranceschi, M.; Gattuso, A.; Fenicia, L.; Ferrini, A.M.; Mannoni, V.; De Luca, G. y Aureli, P. (1999). Clostridium botulinum spores and toxin in Mascarpone cheese and other milk products. *J. F. Protec.* 62 (8): 867-871.
- Frey, T.J.; Coors, J.G.; Shaver, R.D.; Lauer, J.G.; Eilert, D.T. y Flannery P.J. (2004). Selection for silage quality in the Wisconsin quality synthetic and related maize populations. *Crop Sci.* 44, 1200-1208.
- Frisvad, J.C.; Frank, M.J.; Houbraken, J.; Kuijpers, A. y Samson, R.A. (2004). New ochratoxin producing species in *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud Mycol*; 50: 23\_43.
- Frisvad, J.C.; Skouboe, P. y Samson, R.A. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 2-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 442–453.
- Frisvad, J.C.; Nielsen, F.K.; Samson, R.A. (2006). Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxinogenic fungi associated with foods and feeds. *Adv Exp Med Biol.*;571:33-46.
- Frisvad, M.; Meijer, P.; Noonim, W.; Mahakarnchanakul y Samson, R.A. (2007a). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products Available online at [www.studiesinmycology.org](http://www.studiesinmycology.org). *Stud. Mycol.* 59: 53–66.
- Frisvad, J.C.; Larsen, T.O.; de Vries, R.; Meijer, M.; Houbraken, J.; Cabañes, J.; Ehrlich, K. y Samson, R. (2007b). Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Stud Mycol* 59(1): 31-37 2007.
- Fulgueira, C.L.; Borghi, A.L.; y Bracalenti, B.J.C. de. (1989). Inhibición de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 por una cepa de *Streptomyces* spp. *Rev. Microbiol.* 20(2): 215-219.
- Fulgueira, C.L.; Borghi, A.L.; Gattuso, M.A. y Di Sapio, O. (1996). Effects of the infection of toxicogenic fungi and an antagonist *Streptomyces* strain on wheat spikes. *Mycop.* 134: 137-142.
- Fulgueira, C.L. (1998). Comportamiento de hongos toxicogénicos en el ecosistema suelo. Ph.D. thesis, U. N. R., Rosario. República Argentina
- Fulgueira, C.L.; Amigot, S.L.; Gaggiotti, M.; Romero, L.A. y Basílico, J.C. (2007). Forage Quality: Techniques for Testing. *Fresh Prod.* 1 (2): 121-131.
- Gaggiotti, M.C.; Romero, L.A.; Quaino, O.A.; Basílico, J.C. y de Basílico. M.L.Z. (2007). Eficacia del uso de vomitoxina como indicadora de la presencia de otras micotoxinas en silajes. Available online: [http://www.engormix.com/s\\_sarticles\\_view.asp](http://www.engormix.com/s_sarticles_view.asp)

- Gallardo, M. (2007). El valor de los alimentos. Available online: [http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/nutricion/nutricion\\_valordealimentos.htm](http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/nutricion/nutricion_valordealimentos.htm)
- García, A.; Thiex, N.; Kalscheur, K. y Tjardes, K. (2005). Interpretación del análisis del ensilaje de maíz. Extention Extra. College of Agriculture & Biological Sciens, South Dakota. <http://agbiopubs.sdstate.edu/articles/ExEx4002S.pdf>
- Garon, D.; Richard, E.; Sage, L.; Bouchart, V.; Pottier, D. y Lebailly, P. (2006) Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. J. Agric. Food Chem., 54 (9): 3479 -3484.
- Geiser, D.M.; Klich, M.A.; Frisvad, J.C.; Peterson, S.W.; Vargas, J. y Samson, R.A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Stud. Mycol. 59:1-10.
- Gohel, V.; Anil, S.; Maisuria, V.; Phadnis, A. y Chatpar, H.S. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. Af. J. Biotech.. 5 (2), pp. 54-72. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB> .
- Gonzalez Pereyra, V.A.; Alonso, R.; Sager, M.B.; Morlaco, C.E.; Magnoli, A.L.; Astoreca, C.A.R.; Rosa, S.M.; Chiacchiera, A.M.; Dalcerro, A. y Cavaglieri, L.R.. (2008). Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. J. Appl. Microbiol. 104(4): 1034-1041.
- Gotlieb, A. (1997). Causes of Mycotoxins in Silages. Proceedings from the Silage: Field to Feedbunk; North American Conference Hershey, Pennsylvania February 11-13: 213-232.
- Gotlieb, A.R. (2002) Mycotoxins in silage: a silent loss in profits. Available online: <http://www.insurance-portal.com/051502fcs mold.pdf>
- Gotlieb, A. (2004) Mycotoxins In Silage: A Silent Loss In Profits. Boletim N°40. Available online: <http://pss.uvm.edu/vtcrops/articles/Mycotoxins.htm>.
- Gourama, H. y Bullerman, L.B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds. A review. J. Food Prot. 58(12): 1395-1404.
- Hagler, W. y Whitlow, L.W. (2007). Mycotoxins: a review of dairy concerns Available online: [http://www.milkproduction.com/Library/Articles/Mycotoxins-\\_review\\_of\\_dairy\\_concerns.htm](http://www.milkproduction.com/Library/Articles/Mycotoxins-_review_of_dairy_concerns.htm)
- Hawksworth, D.; Kirk, P.; Sutton, B y Pegler, D. (1996). Ainsthworth & Bisby's Dictioniray of the Fungi. 8<sup>th</sup> edn. Oxon. New York: CAB Intenational.
- Heil, M. y Bostock, R.M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. Ann. Bot. 89:503-512.
- Hell, K.; Cardwell, K.F.; Setamou, M. y Poehling, H. (2000). The influence of storage practices on aflatoxins contamintionin maize in four agroecological zone of Benin, west Africa. J. Stored Prod. Res.36,365-382.
- Helmuth, P. (2008). Confeción de Ensilajes y uso de aditivos. Available online: [http://e-cooprinsem.cl/nueva/with\\_fl/html/Cooprinforma/cooprinforma86](http://e-cooprinsem.cl/nueva/with_fl/html/Cooprinforma/cooprinforma86). COOPRINSEM. (Last modification 14/02)
- Herlin, A.H. y Christiansson, A. (1993). Cheese-Blowing Anaerobic Spores in Bulk Milk from Loose-Housed and Tied Dairy-Cows. Milchwissenschaft 48 (12): 686-690.
- Hill,J.; Xiao, G.Q. y Ball, A.S. (2001). Effects of inoculation of herbage prior to ensiling with *Streptomyces achromogenes* ISP5028 on chemical composition of silage. Animal Feed Sci. Tech. 89(1): 83-96.
- Hiraga, K.; Hayashi, S.; Kitzawa, M. y Oda, K. (1999) Isolation and some properties of a novel killer toxin protein produced by *Streptomyces* sp. F287. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(6), 1037-1044.

- Hoffman, P. y Combs, D. (1991). Molds and mycotoxins in corn silage and high moisture corn part I. Managing for Aerobic Stability. Department of Dairy Science, University of Wisconsin-Madison.
- Hohl, T. y Feldmesser, M. (2008) *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. Available online: <http://ec.asm.org/cgi/reprint/EC.00274-07v1.pdf>
- Hollinger, K. y Ekperigin, H.E. (1999). Mycotoxicosis in food producing animals. Vet. Clinics North America: F. Anim. Pract. 15: 133-165.
- Honig, H.; G. Pahlow, J.y Thaysen. (1999). Aerobic instability – Effects and possibilities for its prevention. The XII International Silage Conference. Uppsala, Sweden. Pp 288-289.
- Hoog, G. S. de; Guarro, J.; Gené, J. y Figueras, M. J. (2000). Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, and the Rovira i Virgili University, Reus, Spain
- Hornby, D. (1990). Biological control of soilborne plant pathogens. Oxford, CAB International, Available online: <http://www.forages.psu.edu/agfacts/agfact30.pdf>
- Iglesias, C.; Bach, A.; Devant, M.; Adelantado, C. y Calvo, M.A. (2004). Efectos de la inoculación de *Lactobacillus buchneri* sobre la conservación de ensilados de maíz. *XI Jornadas sobre producción animal ITEA*, 26, 611-613,(2005). Spain. Available online: [http://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/AIDA%202005/programa\\_aida2005.pdf](http://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/AIDA%202005/programa_aida2005.pdf)
- IPEC. (2006). Available online: <http://www.santafe.gov.ar/index.php/web/content/download/40004/203719/file/c0503003.xls>
- Jahn, B.E.; Vidal, V.A. y Soto, O.P. (2000) Sistema de producción de leche basado en alfalfa (*Medicago sativa*) y maíz (*Zea mays*) para la zona Centro Sur. III Consumo y calidad del forraje. Agric. Téc. 60 (2), 99-111.
- Joffe, A. Z. (1986) *Fusarium* species: their biology and toxicology. John Wiley and Sons, New York.
- Kämpfer, P. (2006) The family *Streptomicetaceae*, Part I: taxonomy. In: The prokaryotes Springer, New York.
- Kang, H.; Park, Y. y Go, S. (2003). Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. Microbiol. Res. 158: 321-326.
- Khosaravi, A.; Dakhili, M. y Shokri, H. (2008). A micological survey on feed ingredients and mixed animal feeds in Ghom Province, Iran. Pakistan J. Nut., 7(1):31-34).
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. y Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics, 2nd edn., Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Kim, B.S.; Moon, S. S. y Hwang, B. K. (1999). Isolation, identification and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. Can. J. Bot. 77:850–858.
- Kleinschmit, D.H. y Kung, L. Jr. (2006). A meta analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silage. J. Dairy Sci. Available online: <http://jds.fass.org/cgi/content/full/89/10/4005>.
- Korn-Wendish, F., y Kutzner, H. (1992) The family *Streptomyetaceae*. Chap.41. In: The Prokaryotes 2<sup>nd</sup>.Edition. Albert Balows Ed. New York.
- Kozakiewicz, Z. (1989). *Aspergillus* species on stored products. Mycolog Papers; 161: 1-188.
- Kung, L y Ranjit, NK. (2001). The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. J- Dairy Sci. 84:1149-1155.
- Lascano, C.E. (2002) Caracterización de las pasturas para maximizar producción animal. Arch. Latinoam. Prod. Anim 10 (2): 126-132.

- Lori, G.A.; Carranza, M.R.; Violante, A.; Rizzo, I. y Alippi, H.E. (1992). *Fusarium* spp en trigo, capacidad toxicogénica y quimiotaxonomía de las cepas aisladas en la Argentina. *Agronomie* 12: 459-467.
- Macaulay, A. (2003). Evaluating silage quality silage. Available online: [http://www.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/for4909.html](http://www.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/for4909.html).
- Madigan, M. (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Martinko J (editors) Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-
- Magnusson, J. y Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 1-5.
- Maggie, S. y Perfect, J. (2009). Molds, Hialohyphomycosis, Phaeohyphomycosis and Zygomycosis. *Clinical Chest Med.* 30:337-353
- Mahanna, B. (1997). Troubleshooting silage with seed to feed consideratio. Proceedings from the silage: Field to Feedbunk. North American Conference. Northeast Regional Agricultural Engineering Service. Hershey, Pennsylvania, p 346-375.
- Mallman, C.A. (2007). Micotoxinas en Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves . XX Congreso Latinoamericano de Avicultura. Brasil. Available online: <http://www.lamic.ufsm.br/papers/>
- Martinez, E.; Bragachini, M. y Carluccio, J. (2002). Los plásticos y la conservación de los forrajes y granos en la República Argentina. *J. CIPA.* 21:73-89.
- Mayayo, E.; Pujol I., y Guarro, J. (1999). Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *J Med Microbiol.* 48:363-366.
- McDonald, P.; Henderson, A.R. y Heron, S.J.E. (1991) *The Biochemistry of Silage* (2nd Edn), Chalcombe Publications, Marlow, UK, 340 pp
- McDonald, P.; Edwards, R. A.; Greenhalgh, J. F. y Morgan, C.A (2002) *Animal Nutrition* (6<sup>th</sup> Edition). Longman Scientific a Technical. Harlow, England.
- Miller, J.D. (1995). Fungi and mycotoxins in grain; implications for stored product research. *J. Stored Prod. Res.* 31(1):1-16.
- Monteiro, S.; Barakat, M.; Picarra-Pereira, M.A.; Teixeira, A.R. y Ferreira, R.B. (2003). Osmotin and thaumatin from grape: A putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathol.* 93:1505- 1512.
- Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.*(6): 245-252.
- Montesinos, E. (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. Minireview. *FEMS. Microbiol lett.* 270:1-11.
- Montesinos, E. y Bonaterra, A. (2009). Pesticides, Microbial. Available online: <http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>,
- Montgomery, D. (1995). Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Panamericana. México
- Moss, M.O. (2002a). Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *Intern. Biodet. Biodegrad.* 50, 137-142
- Moss, M.O. (2002b) Mycotoxin review 1: *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist.* 16 (3): 116-119.
- Moss, M.O. (2002c) Mycotoxin review 2: *Fusarium*. *Mycologist* 16 (4), 158-161.
- Muck, R. y Bolsen, K. (1991). Silage preservation and silage additive products. In: Field guide for hay and silage management in North America. (KK Bolsen, JE Baylor and ME McCullough, eds) National Feed Ingredieints, West Does Moiness, IA, USA, pp 105-126.

- Muck, R. (2002). Effects of corn silage inoculants on Aerobic Stability. ASAE Annual International Meeting/CIGR XVth World Congress. Chicago Illinois, USA. July 28-31,.
- Muck, R.E (2004). Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. Transactions of the ASAE USDA (Agricultural research service) 47(4):1011-1016. Available online: <http://www.ars.usda.gov>
- Muck, R.E.y Holmes, B.J. (2006). Bag silo densities and losses. Trans. Am. Soc. Agric. Biol. Eng., 49 (5), 1277-1284.
- Munimbazi, C. y Bullerman, L. (1998). Inhibition of aflatoxin production of *A. parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. Mycopathologie. 140: 163-167.
- Muslim, A.; Horinouchi, H.y Hyakumachi, M. (2003).Biological control of Fusarium wilt of tomato with hypovirulent binucleate *Rhizoctonia* in greenhouse conditions. Mycosci. 44:77-84.
- Naggie, S. y Perfect, J. (2009). Molds: Hyalohyphomycosis, Phaeohyphomycosis, and Zygomycosis. Clin Chest Med 30, 337–353.
- Narendranath, N.V.; Thomas, K.C. y Ingledew, W.M. (2001). Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. J. Am. Brew. Chem., 59, 187-194.
- Nelson, P.E; Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O. (1983). In: *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification, Pennsylvania State University Press, University Park, PA .
- Nicholson, R.L. y Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. Ann. Rev. Phytopathol. 30:369-89.
- Nishino, N.; Wada, H., Yoshida, M. y Shiota, H. (2004). Microbial count, fermentations products, and aerobics stability of whole crop corn and total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. J. Dairy Sci. 87:2563-2570.
- Nyamongo, J. y Okioma, M. (2005). The aflatoxin outbreaks in Kenya in 2004 and 2005: a case study. In: Reducing impact of Mycotoxins in Tropical. Agriculture with emphasis on Health and Trade in Africa, pp: 3.
- O'Brien, M.; O'Kiely, P.; Forristal, P. y Fuller, H. (2007). Visible fungal growth on baled grass silage during the winter feeding season in Ireland and silage characteristics associated with the occurrence of fungi Anim. Feed Sci. Tech., 139 (15) 234-256.
- Ohki, S.; Kariya, E.; Hiraga, K.; Wahamiya, A.; Isobe, T.; Oda, K. y Kainosho, M. (2001). MNR structure of *Streptomyces* Killer toxin like protein, SKLP: futher evidence for the wide distribution of single dominant  $\beta$ Crystallin. J.Mol. Biol. 305:109-120.
- Ojiambo, P.S. y Schern, H. (2006) Biological and application-oriented factors influencing plant disease suppression by biological control: A meta-analytical review. Phytopathology 96: 1168–1174.
- Okoli, I.C. (2005). Mycotoxin contaminants of feedstuff and mycotoxicoses are neglected Livestock Production Research topics in Nigeria. In: Reducing impact of Mycotoxins in Tropical. Agriculture with emphasis on Health and Trade in Africa, pp: 65.
- Olivigni, F.J y Bullerman, L.B. (1977). Simoultaneous production of penicillic acid and patulin by *Penicillium* species isolated from cheddar cheese. J.Food Sci. 42.1654-1657.
- Omiski, K; Marquardt, R.; Sinha, R. y Abramson, D. (1994). Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxins (Miller y Trenholm, eds). Egan Press, St Paul, MN, USA, 287-314.
- Onilude, A.; Fagade, O.E.; Bello, M.M. y Fadahunsi, I.F. (2005). Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. African Journal of Biotechnology 4(12): 1404-1408.

- Ono, M.; Sakuda, S.; Suzuki, A. y Isogai, A. (1997). Aflastatin A, a novel inhibitor of aflatoxin production by aflatoxigenic fungi. *J. Antibiotics* 50(2): 111-118.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). (1983). Criterio de Salud 11. Micotoxinas. Publicación Científica N° 453.
- Ordoqui, M. S.; Mogni, F. y Hervias, D. (2005). Argentina.gov apuntes agroeconómicos Facultad de Agronomía FAUBA. Available online: <http://www.argentina.gov.ar/argentina/portal/estatico/buscador.dhtml?words=tambos&method=and&config=htdig&imageField.x=24&imageField.y=14>
- Ouchdouch, Y; Barakate, M. y Finance, C. (2001). *Actinomycetes* of Moroccan habitats: Isolations and screening for antifungal activity. *Europ. J. Soil boil.* 39: 69-74.
- Oude Elferink, S.; Driehuis, F.; Gottschal, J.C. y Spoelstra, S. (1999a). Silage fermentation processes and their manipulation. FAO Electronic Conference on Tropical Silage. Available online: <http://www.fao.org/doscrep/05/x8486e/8486e08.htm>
- Oude Elferink, S.; Driehuis, F.; Gottschal, J.C. y Spoelstra, S. (1999b). Controlling silage fermentation. Available online: <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/310031>
- Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, J.; Gottschal, J.C.; Spoelstra, S.F.; Faber, F. y Driehuis, F.. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2 propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 125–132.
- Oude Elferink, S.; Driehuis, F.; Gottschal, J.C. y Spoelstra, S.F. (2000). Manipulating silage fermentation. Available online: <http://www.fao.org/docrep/005/x8486e/x8486e09.htm#bm9>.
- Oude Elferink S.; Driehuis, F.; Gottschal, J.C. y Spoelstra, S.F. (2002). Manipulating silage fermentation. Available online: <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/317834>
- Panthier, J.J.; Diem, H.G. y Dommergues, I. (1979). Rapid method to enumerate and isolate soil *Actinomycetes* antagonistic toward rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 2, 441-445
- Pelhate, J. (1975). Mycoflore des maïs fourrages ensiles. *Rev. Mycol.* 39(2):65-95.
- Pelhate, J. (1977). Maize silage: Incidence of moulds during conservation. *Folia Vet. Latina*, 7:1-16.
- Pereira, P.; Nesci, A. y Etcheverry, M. (2007) Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maíz agroecosystem: impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. *Biol. Control* 42(3):281-287.
- Pérez Consuegra, N. (2004). Manejo ecológico de plagas. Cuba, CEDAR, 296 p.
- Perrone, G. A.; Susca, G.; Cozzi, K.; Ehrlich, J.; Varga, J.C.; Frisvad, M.; Meijer, P.; Noonim, W.; Mahakarnchanakul y Samson, R.A. (2007). Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products Available online at [www.studiesinmycology.org](http://www.studiesinmycology.org). *Stud in Mycol* 59: 53–66.
- Pier, A.C. (1992). Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *J. Anim. Sci.* 70:3964-3970.
- Pitt J.I. y Hocking A.D. (1999). *Fungi and Food spoilage*. 3<sup>rd</sup> Edition. Blackie Academic & Professional. Cambridge.
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Med. Mycol.* 38(Suppl. 1):17-2.
- Pitt, J.; Samson, R. y Frisvad, J. (2000). List of accepted species and their teleomorphs in the family Trichocomaceae. In: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus*. Samson RA, Pitt JI, eds. Amsterdam: Harwood Academic Publishers:pp. 9–47.
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D (2007) Biocontrol of aflatoxin in peanuts *Mycopathol.* 162 (3) 233-243.
- Puntenney, S.B.; Wang, Y. y Forsberg, N.E. (2003). Mycotic Infections in livestock: recent insights and studies on etiology, diagnosis and preventions of haemorrhagic Bowel

- Syndrome. In outhwest Nutritions& Management Conference, Phoenix University Of Arizona, Departament of Animal Science, Tuscon, pp.49 -63.
- Raaijmakers, J.M.; Vlami, M. y de Souza, J.T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 537-547.
- Raaijmakers, J.M.; Paulitz, T.C.; Steinberg, C.; Alabouvette, C.y Moëgne-Loccoz, Y. (2008). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms.c. Available online: <http://en.scientificcommons.org/39463702>
- Ranjit, N.K. y Kung, Jr. (2000). Effects of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or chemical preservative on fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 83(3): 526-535.
- Ranjit, N.K.; Taylor, C.C. y Kung, L. (2002) Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. *Grass Forage Sci* 57, 73–811.
- Rankin, M. y Grau, C. (2002). Agronomic considerations for molds and mycotoxins in corn silage. *Focus on Forage* 4 (1), 1-4. Available online:[http://www.uwex.edu/ces/forage/wfc/proceedings2001/dairy\\_mycotoxin.htm](http://www.uwex.edu/ces/forage/wfc/proceedings2001/dairy_mycotoxin.htm)
- Reboux, G.; Reiman, M.; Roussel, S.; Taattola, K.; Millon, L.; Dalphin, J.C. y Piarroux, R. (2006) Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on finnish and French farms. *Ann of Agric.l and EnvironmentalMedicine* 13:267-273.
- Rees, T.J. (1997). The development of a novel antifungal silage inoculant. Doctoral Research Dissertation, Cranfield University Biotechnology Centre, UK. Available online: <http://www.brigton73.freserve.couk/tomsplace/scientific/pdh/pdh-fram.htm>
- Reyes Velázquez, W.; Jiménez Plascencia, C.; Rojo, F.; Figueroa Gómez, M.; Hernández Góborá, J.; Landeros Ramírez, P.; López Ileán, Y;; Isaías Espinosa, V.; Palacios De Lucas, E. y Carlos Juárez, W. (2006). Evaluación de la calidad nutricional y contaminación por hongos y micotoxinas en el ensilado destinado al consumo animal. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA XVII Semana de la Investigación Científica* 813 ISBN 970-27-1045-6.
- Richard, E.; Heutte, N.; Sage, L.; Pottier, D.; Bouchart, V.; Lebailly, P. y Garon D. (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem Toxicol.* 45(12): 2420-2425.
- Richard, E.; Heutte, N.; Bouchart, V. y Garon, D. (2008). Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage. *Anim. Feed Sci Technol.* 148(2): 309-320. .
- Roigé, M.; Arabguren, S.; Denzoin, S.; Soraci, A. y Tapia. (2006). Frecuencia de hongos y prevalencia de micotoxinas en alimentos fermentados y trigo. Presentado en 29° Congr Argentino de Prod. Animal (aapa) Available online: <http://www.aapa.org.ar/congresos/2006/sapdf>.
- Romero, L.A.; Aronna, M.S.y Comerón, E.A. (2003) Evaluación de silaje de sorgo forrajero de nervadura marrón para la producción de leche. *Rev. Argentina Prod. Anim.* 23(1): 10-12.
- Romero, L.A.; Mattera, J.; Comerón, E.A.; Gaggiotti, M.C.y Cuatrin, A. (2006). Evaluación de silajes de planta entera de sorgo granífero con distintos contenidos de tanino. *Rev. Argentina Prod. Anim* 26 (1):169-170.
- Rosen, B.; Merin, U. y Rosenthal, I. (1989). Evaluation of clostridia in raw milk. *Milchwissenschaft* 44 (6): 355-357.
- Samson, R.A. (2000) Mycology and mycotoxins. *Current Fungal Taxonomy and Mycotoxins*. In: de Koe WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M (Eds) *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium*, Proceed. of the Xth Intern. IUPAC Symp. Mycotoxins and Phycotoxins Guarujá, Brazil, p 340-349
- Samson, R.A.; Houbraken, J.; Kuijpers, A.; Frank, M.J. y Frisvad JC. (2004). New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Stud. Mycol.:* 50: 45-61.

- Schawab, E. y Shaver, R (2001). Evaluation of corn silage nutritive value using MILK2000. Available online: <http://www.wis.edu/dysci>.
- Schroeder, J.W. (2004a). Forage nutrition for ruminants AS-1250. Available online: <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1250w.htm>.
- Schroeder, J.W. (2004b) Silage fermentation and preservation AS-1254. Available online: <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1254w.htm>
- Schroeder, J.W. (2004c). Corn silage management AS-1253. Available online: <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1253w.htm>
- Schroeder, J.W. (2004d). Search Stressed-Damaged Crops. AS-1256. Available online: <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1256w.htm>
- Scott, P.M., Lawrence, J.W., y van Walbeck, W. (1970). Detection of mycotoxins by thin layer chromatography. Application to screening of fungal extracts. Appl. Microbiol. 20, 839-842.
- Scott, P.M. (2001) Analysis of agricultural commodities and food for Alternaria mycotoxins. J. AOAC Int. 84(6):1809-1817.
- Scudamore, K. y Livesey, C. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. J. Sci. Food Agric. 77:1-17.
- Seglar, B. (2003) Fermentation analysis and silage quality testing. Available online: <http://www.cvm.umn.edu/img/assets/9090/fermentation%20seglar2003.pdf>.
- Seglar, B. (2004) Efectos de micotoxinas en ganado lechero. Available online: <http://www.asaga.org.ar/magazine/n53/>.
- Soriano del Castillo, J.M. (2007) Ed Diaz de Santos cap. Estrategias para el control de la producción de micotoxinas, pag 77.
- Spoelstra, S.F. (1985). Nitrate in silage. A review. Grass For. Sci., 40: 1-11.
- Stokes, M.E., Davis, C.S. y Koch, G.G., (2000). Categorical Data Analysis 425 Using the SAS System, 2nd ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Ström, K.; Schnürer, J.; Melin, P. (2005). Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. FEMS Microbiol. Lett. 246: 119-124.
- Taysom, D. (2002). U.S. Dairy Forage Research Center: Managing Forage Resources. Available online: <http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid>
- Thomas, E.; Sniffen, C. y Gotlieb, A. (1998). Forage quality parameters vs mycotoxin content of silage at Miner Institute, Chazy, New York. Available online: <http://www.hminer.serverbox.net/research/reports/>.
- Thrane, U., Rasmussen, R. y Sørensen, J. (2007). Micological problems in maize and maize silage. ICFM Workshop, Florida, pp. 21.
- Thylín, I. (2000). Methods of preventing growth of *Clostridium tyrobutyricum* and yeast in silage. Acta Universitatis Agriculturae Suecia . Agraria 223.
- Toth, A. y Romvari, R. (2003). Experimental determine limits of tolerance for fumonisin B1 in weaned piglets, J. Vet. Med. 47: 277-286.
- Trejo-Estrada, S.R.; Paszczyński, A. y Crawford, D.L. (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceoniger* YCED-9. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21(1-2): 81-90.
- Twidwell, E. y Wegenhoff, K. (1999). Forage quality and its value. Available online: [http://www.agecon.lsu.edu/Extension\\_Pubs/Forage\\_Quality\\_and\\_Its\\_value.pdf](http://www.agecon.lsu.edu/Extension_Pubs/Forage_Quality_and_Its_value.pdf) ..

- Ulhoa, C.J. (1996). Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. en V sincobiol Simposio de controle biológico. Anais: conferencias y palestras. Foz de Iguacu-Parana-Brasil. p.234-238.
- Uriarte Archundia, M.E. (2004) Ensilaje echado a perder: ¿se puede evitar? NUTRIX, S.A. Available online:[http://www.oznet.ksu.edu/pr\\_silage/publications/CIGAL](http://www.oznet.ksu.edu/pr_silage/publications/CIGAL).
- Vaidya, R.J.; Shah, I.M.; Vyas, P.R. y Chatpar HS (2001). Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential in antifungal biocontrol World. J. Microbiol. Biotech. 17:691-696.
- Van Driesche, R.G. y Bellows, T.S. (1996). Biological control. Chapman and Hall, New York, pp.539.
- van Os, M. y Dulphy, J.P. (1997). Role of ammonia and biogenic amines in intake of grass silage by ruminants. Available online: <http://library.wur.nl/wda/abstracts/ab2209.html>.
- Varga, J.; Rigó, K.; Molnár, J.; Tóth, B.; Szencz, S.; Téren, J. y Kozakiewicz, Z. (2003). Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *Aspergillus* section *Clavati*. Antonie van Leeuwenhoek 83: 191–200.
- Vartivarian, S. E.; Anaissie, E. J. y Bodey, G. P. (1993). Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. Clin. Infect. Dis. 17: 487-91.
- Venturino, J y Alvarez, P. (2007). Micotoxinas y silo bolsa . Engormix.com. Available online:[http://www.engormix.com/s\\_articles\\_view.asp?](http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?)
- Vero Mendez, S. y Mondino, P. (1999). Control Biológico postcosecha en Uruguay. Horticultura internacional 7(26). Available online: <http://www.horticom.com/portada/>
- Viterbo, A.; Ramot, O.; Chernin, L. y Chet, I. (2002). Significance of Lytic enzymes from *Trichoderma* spp. In the biocontrol of fungal plant pathogens. J. Antonie van Leeuwenhoek. 81:549-556.
- Ward, R. (2005). Evaluating forage quality - What analyses are the best indicators of quality?. Proceedings: Feed and nutritional management cow collage. <http://www.dasc.vt.edu/extension>.
- Weiss, B. (1996). When to consider Silage additives. Tri-State Dairy Nutr. Conf., 125-135.
- Weiss, W. (2001). Determining the Economic Value of Corn Silage Available online: <http://www.farmwest.com/index.cfm?method=library.showPage&librarypageid=161>
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52:487–511.
- Whitlow, L. (1993). Mycotoxin contamination of silages: a potential cause of poor production and health in dairy herds. In: "Silage Production From Seed to Animal". NRAES. 67, Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY.
- Whitlow, L. y Hagler, W. (1998) Effects of mycotoxins on the animal: The producer's perspective. In: *Silage: Field to Feedbunk*. NRAES-99. NRAES, Ithaca, New York, USA, p 222-223.
- Whitlow, L. y Hagler, W. (2000) Mycotoxin contamination of feedstuffs – An additional stress factor for dairy cattle. Available online: [http://www.cals.ncsv.edu/an\\_sci/extension/dairy/mycoto~1.pdf](http://www.cals.ncsv.edu/an_sci/extension/dairy/mycoto~1.pdf).
- Whitlow, L. y Hagler, W. (2002) Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs* 74 (28):1-10.
- Whitlow, L. y Hagler, W.M (2005). Molds and mycotoxins in feedstuffs. Prevention and treatment. <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2005/Whitlow.pdf>
- Whitlow, L. y Hagler, W. (2009). Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle: Effects, Prevention and Treatment. Available online:

- [http://www.extension.org/pages/Mold\\_and\\_Mycotoxin\\_Issues\\_in\\_Dairy\\_Cattle:\\_Effects,\\_Prevention\\_and\\_Treatment](http://www.extension.org/pages/Mold_and_Mycotoxin_Issues_in_Dairy_Cattle:_Effects,_Prevention_and_Treatment)
- Wilkinson, J. M. (1999). Silage and health. In Proceed. of the 12th International Silage Conference. University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden., pp. 67-81.
- Williams, S.T.; Goodfellow, M., y Alderson, G. (1989). Genus *Streptomyces*. In: Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol. 4. Williams ST, Sharpe ME, Holt JG Eds. Williams & Wilkins. Baltimore: 2452-2492.
- Wilson, C.L., Wisniewski, E., El-Ghaouth, A., Droby, S. y Chalutz, E. (1996). Comercialization of antagonistic yeasts for the biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. SIM News. 46:5: 237-242.
- Wilson, C.L. y Wisniewski, M.I.(1992). Futures alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases p.133-138 en Biological Control Of Plant diseases, edited by E.S. Tjamos et al., Plenum Press, New York
- Wilson, C. y Droby, S. (2001). Microbial food contamination. Wilson, C y Droby ed. CRC press LLC Boca Raton, USA .pp 290.
- Wilson, M. y Backman, P. (1998). Biological control of plant pathogens. Ruberson, J. R. (Ed.). En: Handbook of Pest Management. Marcel Dekker.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem J. 322:681-692
- Woolford, M.K. (1984). The silage fermentation. Marcel Dekker, New York
- Woolford, M.K.; Cook, JE, Hall, D.M. y Bonis, A. (1980). The use of pimaricin as an additive to improve the aerobic stability of silage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 31:558-566.
- Wyss, U. (1999). Influence of pre-wilting degree on aerobic stability of grass silages. In Proceed. of The XIInd International Silage Conference, Uppsala, Sweden.; pp. 284-285.
- Yiannikouris A y Jouany JP (2002a) Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. Animal Research 51, 81-99
- Yiannikouris A, Jouany JP (2002b) Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA Productions Animales 15 (1): 16 131.

*Apēndice*

San Miguel de Tucumán, 11 de Febrero de 2008

## INFORME

### **Servicio solicitado:**

#### **Identificación de bacterias mediante biología molecular:**

Se realizaron los siguientes ensayos:

- > Extracción ADN cromosómico
- > Amplificación región de ADN codificante para la región de ARN 16S mediante PCR
- > Purificación del fragmento obtenido
- > Secuenciación
- > Análisis de secuencia

**Solicitante: Universidad Nacional de Rosario (Dra. Cecilia Fulgueira)**

### **1- Identificación genética de microorganismos mediante amplificación y secuenciación de la región de ADN codificante para la región variable VI de ARN 16S**

Se aisló ADN de la cepa suministrada por el solicitante y se utilizó como molde para amplificar la región de ADN que codifica para la región variable VI del ARN16S, mediante PCR. Para ello se usaron cebadores específicos y se emplearon protocolos de amplificación estandarizados en el Laboratorio de Tecnología y Desarrollo de CERELA. Se obtuvo el fragmento esperado de aproximadamente 500 pb el cual fue purificado y secuenciado. Los resultados obtenidos se presentan en hojas adicionales.

### **Conclusiones:**

El análisis comparativo de las secuencias obtenidas con las descritas en las distintas bases de datos, mostró una elevada identidad con cepas pertenecientes al Genero *Lactobacillus* y dentro de este género con la especie *buchneri* (ver hojas adicionales).

**Responsables:**

**Dra. Elvira María Hebert**

**Dra. María Pía Taranto**

**Lab. Tecnología y Desarrollo. CERELA-CONICET**

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">AB262982.1</a>	Lactobacillus sp. NGR1 0001 gene for 16S ribosomal RNA, cc	665	665	100%	0.0	95%	
<a href="#">EU921292.1</a>	Lactobacillus buchneri strain OPY-2 16S ribosomal RNA gene	665	665	100%	0.0	95%	
<a href="#">AB283056.1</a>	Lactobacillus buchneri gene for 16S rRNA, partial sequence	660	660	100%	0.0	95%	
<a href="#">AB283054.1</a>	Lactobacillus buchneri gene for 16S rRNA, partial sequence	660	660	100%	0.0	95%	
<a href="#">AB283053.1</a>	Lactobacillus buchneri gene for 16S rRNA, partial sequence	660	660	100%	0.0	95%	
<a href="#">EF102890.1</a>	Lactobacillus buchneri strain OPM-2 16S ribosomal RNA gene	660	660	100%	0.0	95%	
<a href="#">AB201056.1</a>	Lactobacillus buchneri gene for 16S ribosomal RNA, partial s	660	660	100%	0.0	95%	
<a href="#">DQ987924.1</a>	Lactobacillus buchneri strain NRRL B-30929 16S ribosomal R	656	656	100%	0.0	95%	
<a href="#">AB20611.1</a>	Lactobacillus buchneri gene for 16S rRNA, partial sequence	648	649	100%	0.0	95%	
<a href="#">EF534231.1</a>	Lactobacillus parabuchneri strain 2173 16S ribosomal RNA c	638	638	100%	6e-180	95%	
<a href="#">AB276879.1</a>	Lactobacillus parakefiri gene for 16S ribosomal RNA, partial	636	636	99%	2e-179	95%	
<a href="#">AB289232.1</a>	Lactobacillus parakefiri gene for 16S rRNA, partial sequence	636	636	99%	2e-179	95%	
<a href="#">AB289232.1</a>	Lactobacillus parakefiri gene for 16S rRNA, partial sequence	636	636	99%	2e-179	95%	
<a href="#">AY026750.1</a>	Lactobacillus parakefiri 16S ribosomal RNA gene, partial seq	636	636	99%	2e-179	95%	
<a href="#">AB276877.1</a>	Lactobacillus parabuchneri gene for 16S ribosomal RNA, par	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AB289212.1</a>	Lactobacillus parabuchneri gene for 16S rRNA, partial sequ	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AB289210.1</a>	Lactobacillus parabuchneri gene for 16S rRNA, partial sequ	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AB289187.1</a>	Lactobacillus kefiri gene for 16S rRNA, partial sequence, str	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AY575584.1</a>	Lactobacillus kefiri strain JCM 5818 16S ribosomal RNA gene	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AF375934.1</a>	Lactobacillus parabuchneri strain YD77 16S ribosomal RNA q	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AY363802.1</a>	Lactobacillus kefiri 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AJ970317.1</a>	Lactobacillus parabuchneri 16S rRNA gene, type strain: LMG	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AY026751.1</a>	Lactobacillus parabuchneri 16S ribosomal RNA gene, partial	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AB201056.1</a>	Lactobacillus parabuchneri gene for 16S ribosomal RNA, par	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AF494464.1</a>	Lactobacillus ferintoshensis ATCC 11307 16S ribosomal RNA	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AB024300.1</a>	Lactobacillus kefiri gene for 16S rRNA, strain:NRIC 1693	632	632	100%	3e-178	95%	
<a href="#">AB262681.1</a>	Lactobacillus kefiri gene for 16S rRNA, partial sequence, str	628	628	100%	4e-177	95%	
<a href="#">AB262680.1</a>	Lactobacillus kefiri gene for 16S rRNA, partial sequence, str	628	628	100%	4e-177	95%	
<a href="#">AY575586.1</a>	Lactobacillus sp. CIDCA 8348 16S ribosomal RNA gene, part	628	628	99%	4e-177	95%	
<a href="#">AF375911.1</a>	Lactobacillus parabuchneri strain RATT13 16S ribosomal RN	628	628	100%	4e-177	95%	
<a href="#">AF375910.1</a>	Lactobacillus parabuchneri strain RATT12 16S ribosomal RN	628	628	100%	4e-177	95%	
<a href="#">AB289211.1</a>	Lactobacillus parabuchneri gene for 16S rRNA, partial sequ	627	627	100%	1e-176	95%	
<a href="#">AJ621553.1</a>	Lactobacillus kefiri partial 16S rRNA gene, strain LMG 9480T	627	627	100%	1e-176	95%	
<a href="#">AF274311.1</a>	Lactobacillus ferintoshensis 16S ribosomal RNA gene, part	627	627	100%	1e-176	95%	
<a href="#">AY596773.1</a>	Lactobacillus parabuchneri strain IBS3 16S ribosomal RNA ge	625	625	100%	5e-176	94%	

### Seqmatch :: Results for Query Sequences under Bacteria

**Seqmatch:** version 3  
**RDP Data:** release 9.53  
**Data Set:** both type and non-type strains, both environmental (uncultured) sequences and isolates, short sequences (<1200 bases), both good quality and suspect quality sequences  
**Comments:** 296419 sequences were included in the search  
 The screening was based on 7-base oligomers  
**Query Submit Date:** Mon Feb 11 08:40:51 EST 2008

Match hit format: short ID, orientation, **similarity score**, **S\_ab score**, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

**Lineage:**

**Results for Query Sequence: unknown, 325 unique oligos**

```

domain Bacteria (20) (match sequences)
  phylum Firmicutes (20)
    class Bacilli (24)
      order Lactobacillales (20)
        family Lactobacillaceae (20)
          genus Lactobacillus (20)
            S000362673 - not_calculated 0.843 0573 Lactobacillus parabuchneri; Ib53; AY590775
            S000392626 - not_calculated 0.865 0460 Lactobacillus parabuchneri; RRTT12; AF375910
            S000392627 - not_calculated 0.874 0462 Lactobacillus parabuchneri; RRTT13; AF375911
            S000392650 - not_calculated 0.877 0466 Lactobacillus parabuchneri; YDT7; AF375934
            S000617152 - not_calculated 0.877 0500 Lactobacillus parabuchneri; ATCC 11307; AF429464
            S000775017 - not_calculated 0.951 0673 Lactobacillus buchneri; JCM 1068; AB289053
            S000775018 - not_calculated 0.951 0599 Lactobacillus buchneri; JCM 1069; AB289054
            S000775019 - not_calculated 0.951 0654 Lactobacillus buchneri; JCM 1115; AB289055
            S000775071 - not_calculated 0.803 0665 Lactobacillus sp.; JCM 2761; AB289107
            S000775074 - not_calculated 0.803 0670 Lactobacillus sp.; JCM 2768; AB289110
            S000775151 - not_calculated 0.851 0629 Lactobacillus kefirii; JCM 5818; AB189187
            S000775174 - not_calculated 0.882 0610 Lactobacillus parabuchneri; JCM 1162; AB289210
            S000775175 - not_calculated 0.855 0476 Lactobacillus parabuchneri; JCM 12493; AB289211
            S000775176 - not_calculated 0.882 0629 Lactobacillus parabuchneri; JCM 12511; AB289212
            S000775196 - not_calculated 0.908 0588 Lactobacillus parakefirii; JCM 8573; AB289232
            S000775197 - not_calculated 0.908 0601 Lactobacillus parakefirii; JCM 8574; AB289233
            S000775237 - not_calculated 0.800 0585 Lactobacillus sp.; JCM 2762; AB289273
            S000775238 - not_calculated 0.800 0736 Lactobacillus sp.; JCM 2763; AB289274
            S000776282 - not_calculated 0.931 0954 Lactobacillus buchneri; DPM-2; EF102890
            S000927083 - not_calculated 0.965 0864 Lactobacillus buchneri; DPM-2; EU091290
  
```

*Agradecimientos*

Son muchas las personas que hicieron posible este trabajo y a las que quiero y debo agradecer.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los Directores de esta tesis Doctoral Dr Juan Carlos Basílico y Dra. Cecilia Fulgueira por la confianza al aceptarme como tesista, por todo lo que pude aprender de ellos y por la inestimable ayuda en el desarrollo de este trabajo.

Gracias a mi amiga Cecilia por su ayuda, apoyo y contención, gracias ¡Cecil!

A la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por aceptarme como doctorando y especialmente a la Dra. Adriana Ortolani. A la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química por la cálida y desinteresada colaboración.

Al CEREMIC de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, por permitirme realizar en sus laboratorios la etapa experimental de este trabajo.

Gracias a Liliana Giraudo y a Mónica De Luca por su colaboración en la preparación de los medios de cultivo que utilicé en el trabajo.

Gracias Lili por tu apoyo espiritual.

A Chiquita y Male por la contención y comprensión.

A Alicia y Marisa por su aliento permanente.

A todos mis compañeros del CEREMIC, gracias a todos porque de una forma u otra me dieron fuerzas para seguir adelante.

Al Dr Rubén D'esposito por su ayuda desinteresada e inestimable para la confección de los microsilos experimentales.

Al Dr. Eduardo Anchart, por incluirme en muchos de sus proyectos relacionados a la DSLyAC de Municipalidad de Rosario. Por su paciencia y comprensión en la dilación de ellos por este, mi proyecto, Gracias Eduardo.

Y por último, y no por ello menos importante a mi familia: a mis padres que me enseñaron que el esfuerzo nunca es mucho y que en la vida hay que *ser un Señor antes que Dr.* ¡¡¡Gracias viejos!!!!

A mi hermana, a Agus y Estefi.

A Nacho por su colaboración y paciencia en la confección de la tapa.

A mis tías, cuñados y sobrinos por el cariño y la ayuda recibida.

Gracias a Gustavo, mi esposo, y especialmente mis hijitos Tomás y Lucrecia que han soportado la ausencia de madre todos estos años, a ellos especialmente perdón.