

EVOLUCION DE LA FLORA MICROBIANA EN UN ENSILAJE DE KING GRASS

Lisette Luis y Marisol Ramírez

**Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
Matanzas, Cuba**

Para estudiar el desarrollo de la flora microbiana y su relación con los parámetros bioquímicos en el ensilaje fue utilizado king grass con 10 semanas de rebrote, fertilizado con 60 kg de N por hectárea por corte y con un contenido superior al 25% de MS. La unidad experimental utilizada fueron silos de laboratorio tipo Cullinson. La toma de muestras se realizó a los 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 días de conservación. Se determinaron los siguientes indicadores: MS, concentración de microorganismos, pH, nitrógeno amoniacal y AGV individual. La materia seca del forraje favoreció el proceso fermentativo, al dar origen a un pH estable, con fermentación predominantemente láctica y valores de nitrógeno amoniacal menores del 5%, lo que nos permite asegurar que este forraje en las condiciones experimentales estudiadas, constituye una buena opción para la elaboración de ensilaje de calidad.

Palabras clave: *Flora microbiana, ensilaje, king grass*

A king grass sward fertilized with 60 kg of N/ha/cut and with 10 weeks of regrowth having a DM content higher than 25%, was ensilaged in order to study microbial flora development and its relation with biochemical parameters. Cullinson silos were assumed to be the experimental unit. Sampling of silage material was made after 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 60, 90 and 120 days of conservation. DM, microorganism concentration, pH, amonia nitrogen and volatile fatty acid were determined. Fermentative process was favoured by the DM content and an stable pH was originated where a predominant lactic fermentation occurred and amonia nitrogen values lower than 5% were recorded. This situation permits to assure that this forage constitute a suitable option for making good quality silage under the studied experimental conditions.

Additional index words: *Microbial flora, silage, king grass*

El king grass no solo presenta un buen establecimiento y altos rendimientos, sino que además posee niveles de consumo y rendimientos de proteína digestible y energía metabolizable superiores a los de otros forrajes, por lo que es ampliamente utilizado en nuestro país

como alimento verde y en forma de ensilaje.

Trabajos realizados anteriormente en ensilajes de pastos tropicales dieron como resultado que el proceso fermentativo tuvo un comportamiento similar en los 4 pastos estudiados: fermentación láctica

inicial e inversión posterior de esta hacia la fermentación acética e inestabilidad en el pH del medio, independientemente de la concentración de bacterias ácido lácticas que fue elevada (Luis y Ramírez, 1985; 1986; 1988).

El objetivo de esta experiencia fue conocer el comportamiento de los microorganismos y de la fermentación en ensilaje de king grass.

MATERIALES Y METODOS

Tratamiento y diseño. El king grass (*P. purpureum* x *P. typhoides*) de 10 semanas de rebrote y fertilizado con 60 kg por hectárea por corte fue utilizado para estudiar el desarrollo de los microorganismos más importantes que proliferan en el material ensilado y su relación con los indicadores bioquímicos.

El pasto presentó un contenido de proteína cruda de 5,9% y 25,2% de MS.

El muestreo se realizó a los 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 días de conservación en silos tipo Cullinson con una capacidad aproximada de 200 g.

Para realizar los análisis microbiológicos se maceraron 30 g de hierba fresca ensilada con 270 ml de solución salina al 0,9%, agitándose fuertemente durante 2 min. Esta solución madre fue utilizada para confeccionar diluciones hasta 10^{-8} . Cada dilución fue replicada dos veces y se realizaron dos inoculaciones con cada una de ellas, utilizando un diseño totalmente aleatorizado.

Métodos analíticos. Los medios de cultivo utilizados para determinar el crecimiento microbiano fueron preparados a partir de sus componentes según el Oxoid Manual (1976), medio RBA (Red Bile Agar) para enterobacterias; medio BLA (Buffer Yeast Agar) para el desarrollo de hongos y medio MRS (Rogosa Agar) para bacterias ácido lácticas. El conteo de viables se efectuó en cámara contadora de colonias y se utilizó el

método de dilución y plaqueo (Heydrich y Cruz, 1978).

La temperatura y el tiempo de incubación para cada medio fueron los siguientes:

Medio	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (hr)
RBA	35-37	24~28
BLA	Ambiente	72
MRA	35-37	120

Los indicadores bioquímicos y bromatológicos que se determinaron fueron: la MS en estufa de ventilación forzada a 70°C durante 48 h, sin corregir las pérdidas; el pH medido en potenciómetro con electrodo de vidrio; ácidos grasos volátiles por el método de Baule y Weissbach (1963) y producción de amoníaco por el método de microdifusión de Conway (1957).

RESULTADOS

La MS del ensilaje osciló entre 22,9 y 27,1%, con una media de 24,9%, lo que refleja un mínimo de pérdidas por este concepto.

Las variaciones registradas en el pH del medio (fig. 1) no fueron muy marcadas, ya que a partir de los 2 días de conservación este se mantuvo en valores cercanos a 4,0. El crecimiento de las bacterias ácido lácticas fue en ascenso durante los 10 primeros días de conservación, tiempo en el cual alcanzó la mayor concentración que fue de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC)/g. A partir de este momento disminuyó la cantidad de células y a los 120 días se detectaron 10^5 UFC/g de material (fig. 2).

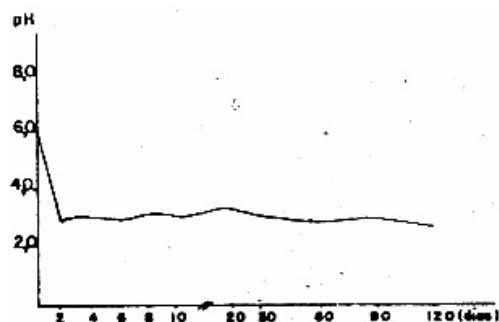


Fig. 1. Cambios en el pH del medio.

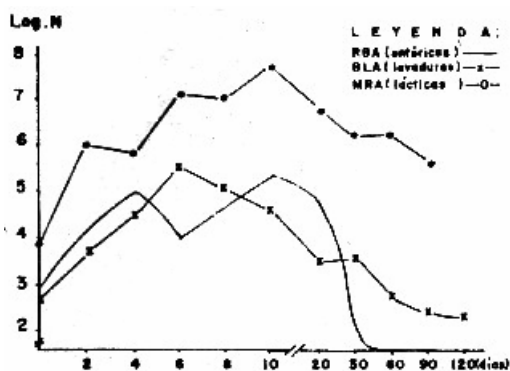


Fig. 2. Variaciones en el crecimiento de los diferentes grupos de microorganismos.

Hasta los 6 días de conservación se incrementó la concentración de levaduras, para disminuir posteriormente hasta una concentración similar a la inicial (10^4 UFC/g de MS) (fig. 2).

A pesar de que la cantidad de UFC/g de MS mostró un ligero descenso a los 6 días de conservación, el crecimiento de las bacterias entéricas tuvo una tendencia a incrementarse hasta los 10 días, disminuyendo en los tiempos siguientes hasta desaparecer completamente a los 30 días de ensilaje.

En correspondencia con el desarrollo de la flora microbiana, observamos que la cantidad de ácido láctico producida fue superior a la de los otros ácidos, incluso al final de la experiencia, en que estuvo por debajo de su concentración inicial. El

ácido acético se mantuvo durante el proceso por debajo del 2%, mientras que la producción de ácido butírico se inició en forma marcada a partir de los 30 días de conservación (fig. 3).

La producción de $N-NH_3/NT$ estuvo por debajo del 5% durante casi todo el proceso, excepto en los tiempos 4 y 30 días en que sobrepasó este valor (fig. 4).

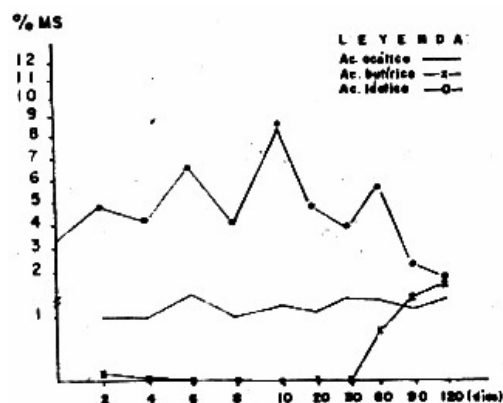


Fig. 3. Evolución de los AGV individuales durante la conservación.

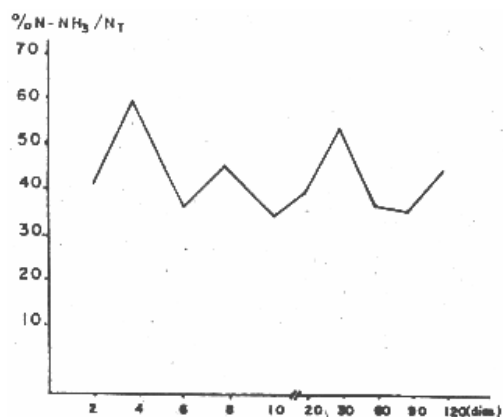


Fig. 4. Producción de $N-NH_3$ en ensilajes de king grass.

DISCUSION

Cuando la MS sobrepasa el 25 del material verde, los niveles de efluentes son adecuados y no se producen grandes pérdidas de hidratos de carbono por

esta vía (Mudd, 1979); además, se ha demostrado (Meissonnier y Soyeux, 1979) que cuando el contenido de MS está por encima de 35 y por debajo de 20 se producen pérdidas, ya sea por retardo en las fermentaciones y por recalentamiento en el primer caso o por pérdidas de jugos, lo que atenta contra la calidad del ensilaje. Por ello se consideró que el porcentaje de MS del ensilaje analizado fue el adecuado para que se produjera una buena fermentación.

El rápido descenso del pH en los ensilajes garantiza un habitat desfavorable para las bacterias clostrídicas y para que se produzca una alta respiración, con lo que se evita la preotólisis producida por las enzimas proteolíticas y la proliferación de grupos microbiológicos indeseables involucrados en el proceso fermentativo (Dellaglio y Santi, 1984).

El contenido de MS y el pH de los ensilajes están estrechamente unidos, lo cual fue demostrado por Wieringa (1977) al encontrar una relación lineal entre ambos indicadores; en este sentido, los niveles de pH alcanzados estuvieron en correspondencia con el contenido de MS de los ensilajes analizados, valorándose estos como ensilajes estables.

El valor del pH cercano a 4,0 encontrado en el ensilaje estudiado debió favorecer el proceso de conservación y aunque la producción de ácido láctico fue superior a la de otros ácidos, en correspondencia con el crecimiento de las bacterias lácticas que presentaron un desarrollo similar al descrito por Luis y Ramírez (1985; 1988), este no logró inhibir el desarrollo de las bacterias coliformes, ni de las levaduras. Resultados similares fueron encontrados por Luis y Ramírez (1986) al estudiar la fermentación en ensilaje de guinea SIH-127.

Las bacterias coliformes, de acuerdo con la secuencia de eventos descrita por Woolford (1985), debieron multiplicarse hasta el séptimo día de conservación

aproximadamente, para después ser sustituidas parcialmente por cocos lácticos; sin embargo, estas bacterias estuvieron presentes durante los primeros 30 días de conservación, debido a la habilidad de algunas para crecer en condiciones de anaerobiosis y de protegerse ante condiciones adversas (pH bajo), lo que está muy relacionado con el poder de supervivencia de cada género.

Las levaduras han sido observadas con un comportamiento similar en ensilaje de otros pastos tropicales (Luis y Ramírez, 1985; 1986), influenciado ello en primer lugar por la competencia establecida por el sustrato entre diferentes microorganismos, por la capacidad de crecer en anaerobiosis y de crecer a pH bajos.

La baja producción de ácido acético nos hace pensar que el tipo de bacteria ácido láctica dominante fue la homofermentativa, lo que favoreció la formación de ácido láctico, y que la fermentación producida por las levaduras fue eminentemente alcohólica, aunque los alcoholes no fueron determinados.

El ácido butírico comenzó a producirse a los 30 días de conservación a expensas del ácido láctico formado, ya que las bacterias clostrídicas, responsables de la fermentación butírica, obtienen energía utilizando azúcares y ácido láctico y aportan ácido butírico, CO₂ e hidrógeno (Vanbelle, Bertin y Hellings, 1985).

Meissonnier y Soyeux (1979) hallaron que contenidos de NT mayores que 16% disminuían la fermentación láctica, aumentando la degradación proteica, lo que provocaba acumulación de nitrógeno amoniacal hasta niveles del 15 al 30%. El king grass utilizado en nuestra experiencia presentó un porcentaje inferior a 16 (5,9%) y la cantidad de NH₃/NT producida estuvo por debajo de 5%, valor considerado por Dulphy, Demarquilly y Michalet-Doreau (1978) como adecuado para un ensilaje de excelente calidad.

De los resultados obtenidos en esta experiencia concluimos que el king grass en las condiciones experimentales utilizadas es una buena opción para la fabricación de ensilaje, en comparación con otros forrajes tropicales, ya que presentó un contenido de MS superior al 25%, un pH estable, acompañado de una fermentación láctica y valores aceptables en los indicadores bioquímicos que se determinaron.

REFERENCIAS

- BAULE, A. & WEISSBACH, F. 1963. Zietseiff. landre versuch und untersschurg wesen 9. Bund Heft 6
- CONWAY, E.F. 1957. Microdifusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood. London
- DELLAGLIO, F. & SANTI, E. 1984. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*. 2:109
- DULPHY, J.P.; DEMAROUILLY, C. & MICHALET-DOREAU, B. 1978. Bareme d'appréciation qualitative des ensilage. Document interne du laboratoire des aliments. INRA. Theix
- HEYDRICH, MAYRA & CRUZ, M. 1978. Folleto de prácticas de Microbiología general. Impresión "André Voisin". Cuba. p. 39
- LUIS, LISSETTE & RAMIREZ, MARISOL. 1985. *Pastos y Forrajes*. 8:141
- LUIS, LISSETTE & RAMIREZ, MARISOL. 1986. *Pastos y Forrajes*. 9:147
- LUIS, LISSETTE & RAMIREZ, MARISOL. 1988. *Pastos y Forrajes*. 11:88
- MEISSONNIER, E. & SOYEUX, Y. 1979. Consequences pathologiques l' utilisation des ensilages. Journee CAAA du w mars. p. 165-182
- MUDD, J.A. 1979. Journee CAAA du 2 rnars. p. 102-118.
- OXOID MANUAL. 1976. Third edition (revised). Published by Oxoid Limited. Wade Rood, Basingstoke. Hampshire. p. 264
- VANBELLE, M.; BERTIN, G. & HELLINGS, Ph. 1985. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*. 3:1
- WIERINGA, G.W. 1977. Influence of moisture and nutrient content of forage plants on fermentation processes. Proc. Int. Meeting on Anim. Prod. for temp. Grassld. Dublin. p. 133-136
- WOOLFORD, M.K. 1985. The silage fermentation Chapter 3. Marcel Dikker, Inc. New York. p. 85-112