

ESTUDIO DE ALGUNOS INDICADORES BIOQUIMICOS Y MICROBIOLOGICOS EN ENSILAJE DE CRA-265

Lisette Luis y Marisol Ramírez

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

Se realizó un estudio en CRA-265 para determinar el desarrollo de los principales grupos de microorganismos presentes en el material conservado, así como su relación con la actividad bioquímica. En silos de laboratorio tipo Cullison, fueron tomadas las muestras a los 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 días de conservación. A pesar de haberse logrado la disminución del pH hasta valores cercanos a 4,0 desde los 4 hasta los 60 días, este no logros inhibir el desarrollo de las bacterias clostrídicas, productoras de ácido butírico, que fueron estimuladas por el bajo contenido de MS. El desarrollo de otros microorganismos como bacterias homo y heterofermentativas y levaduras, propició el cambio en la orientación de la fermentación cerca de los 60 días, al producirse más cantidad de ácido acético que de láctico. El por ciento de MS del forraje influyó de forma importante sobre el comportamiento del ensilaje, por lo que se sugiere tomar en consideración este factor en la confección de los ensilajes.

Palabras clave: *Microorganismos, bacterias clostrídicas, bacterias homo y heterofermentativas, ácidos orgánicos*

A study was carried out on cultivar CRA-265 in order to determine the development of the main microorganism groups present in the conserved material as well as its relation with the biochemical activity. Samples were taken during 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 60, 90 and 120 days of conservation in Cullison laboratory silo. Inhibition was not found in the development of clostridial bacteria which produce butyric acid and were stimulated by the low DM content, in spite of the pH diminution until nearly 4,0 from 4th to 60 days. Other microorganisms that were developed such as yeast, homo and heterofermentative bacteria changed the trends of fermentation during the 60 days while producing more acetic acid than lactic acid. DM per cent of the forage influenced upon silage behaviour in an important way, whereby this factor is suggested to be taken into consideration for silages preparation.

Additional index words: *Microorganisms, clostridial bacteria, homo and heterofermentative bacteria, organic acids*

El material conservado como ensilaje sufre un proceso de fermentación intenso, llevado a cabo por la acción combinada de las enzimas bacterianas y de la planta; los microorganismos anaerobios son los máximos responsables de este proceso, y de la participación de estos en la conservación va a depender en última instancia la calidad del ensilaje.

La flora microbiana que favorece la conservación es la denominada ácido láctica, la cual aporta, como producto de su metabolismo, el ácido láctico responsable de la rápida acidificación del medio.

Este trabajo tiene como objetivo profundizar en el conocimiento de los cambios microbiológicos que se producen durante la fermentación y su relación con las variaciones bioquímicas registradas en el material durante el proceso de conservación de *Pennisetum purpureum* cv. CRA-265. Este cultivar ha sido recomendado como variedad comercial por poseer un follaje exuberante y vigoroso, buena adaptación a diferentes tipos de suelo y rendimientos satisfactorios.

MATERIALES Y METODOS

Tratamientos y diseño. El CRA-265 (*Pennisetum purpureum*) de 6 semanas de rebrote y fertilizado con 60 kg de N/ha/corte, fue utilizado para estudiar el desarrollo de tres importantes grupos de microorganismos presentes en el material ensilado y su relación con los indicadores bioquímicos. El pasto presentó un contenido de proteína bruta (PB) de 7,6% y 20,65% de materia seca (MS).

Para realizar esta experiencia se utilizaron silos tipo Cullison de 200 g de capacidad aproximadamente, que se muestrearon a los 0, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 días de conservado el material.

Del material fresco o ensilado fueron pesados 30 g, los que se maceraron en

270 ml de solución salina estéril al 0,9%. A partir de esta solución fueron preparadas diluciones hasta 10^{-8} . Cada dilución fue replicada dos veces y se realizaron dos inoculaciones con cada una de ellas.

En esta experiencia se utilizó un diseño totalmente aleatorizado.

Métodos analíticos. Se utilizó el método de dilución y plaqueo (Heydrich y Cruz, 1978) efectuándose el conteo de microorganismos viables en cámara contadora de colonias; los medios de cultivo utilizados para este fin fueron preparados a partir de sus componentes según el Oxoid Manual (1976); Medio RBA (Red Bile Agar) para crecimiento de bacterias entéricas; medio BLA (Buffel Yeast Agar) para detectar mohos y levaduras y medio MRA (Rogosa Agar) para aislar bacterias lácticas.

El proceso de incubación y la temperatura para cada medio fueron los siguientes:

Medio	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (hr)
RBA	35~37	24~48
BLA	Ambiente	72
MRA	35~37	120

Los indicadores bioquímicos y bromatológicos determinados fueron: la MS, en estufa a 70°C sin corregir las pérdidas; el pH, medido en potenciómetro con electrodo de vidrio; ácidos grasos volátiles individuales por el método de Baule y Weissbach (1963); producción de amoníaco por el método de microdifusión de Conway (1957) y el nitrógeno total, por Kjeldahl, determinado en fresco (AOAC, 1960).

RESULTADOS

La materia seca promedio del ensilaje fue de 19,41%, mientras que la proteína bruta alcanzó el 7,2%.

El desarrollo de los microorganismos se refleja en la figura 1. Durante los 6 primeros días de conservación, se produjo la multiplicación de las bacterias ácido lácticas, que alcanzaron en ese momento su concentración más elevada (10^8 /g de MS). A partir de los 6 días se produjo una disminución de la concentración hasta los 30 días, momento a partir del cual se logró una estabilización de la población, que se mantuvo aun a los 90 días y decayó posteriormente hasta alcanzar valores cercanos a los iniciales.

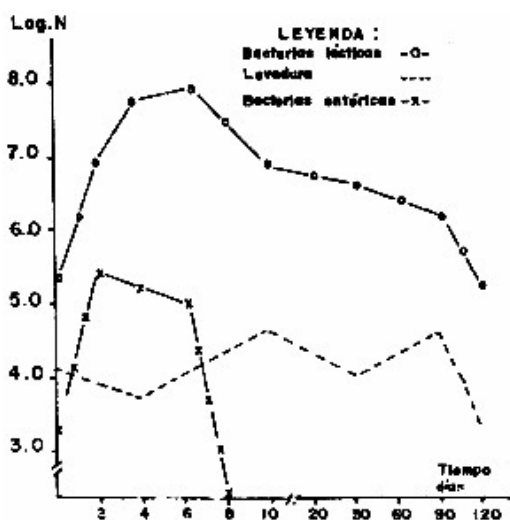


Fig. 1. Principales grupos de microorganismos presentes en el ensilaje.

El desarrollo máximo de las bacterias entéricas se detectó a los 2 días de conservación y posteriormente se produjo su disminución, hasta desaparecer completamente a los 8 días; mientras que el contenido de levaduras mostró un desarrollo inestable, aumentando y disminuyendo indistintamente su concentración durante toda la experiencia. Su máximo crecimiento se detectó a los 10 días de conservación (10^5 /g de MS).

Los cambios ocurridos en el pH del medio se muestran en la figura 2. Al cuarto día de iniciado el proceso el pH descendió a 4,0 y se mantuvo alrededor

de este valor hasta los 60 días en que comenzó a incrementarse y alcanzó a los 120 días un valor de 4,9.

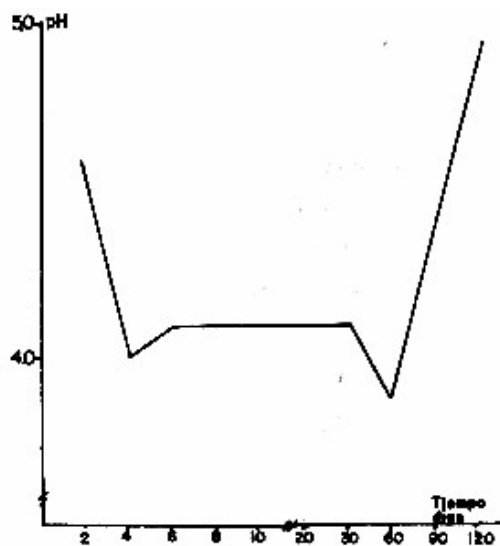


Fig. 2. Cambios en el pH del medio.

El valor máximo del ácido láctico se observó a los 10 días de haberse iniciado la fermentación, como se muestra en la figura 3. A partir de este momento descendió bruscamente hasta su menor valor a los 120 días de conservación. No ocurrió así con los ácidos acético y butírico, que después de los 30 días de conservado el material aumentaron nuevamente su concentración.

En la figura 4 pueden observarse los cambios porcentuales de los ácidos grasos. En forma general se detectó que al inicio del proceso predominó el ácido láctico hasta los 60 días, tiempo a partir del cual prevaleció el ácido acético. El ácido butírico estuvo por debajo del ácido láctico en casi todo el período analizado, excepto a los 20 y 120 días; mientras que superó el ácido acético sólo a los 10 y los 20 días de conservación.

El contenido de $N-NH_3$ fue máximo a los 8 días de fermentación (4,9%), momento a partir del cual descendió, para mantenerse alrededor del 3%

durante el resto del proceso de ensilaje, excepto a los 120 días, donde se detectó un valor cercano al 2% (fig. 5).

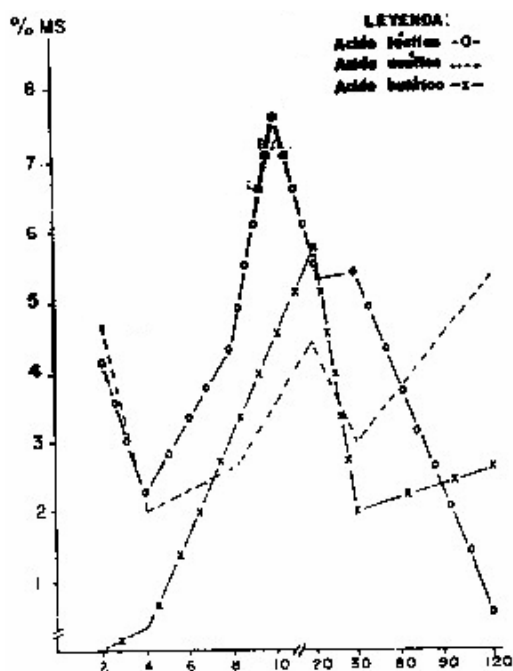


Fig. 3. Evolución de los ácidos grasos volátiles.

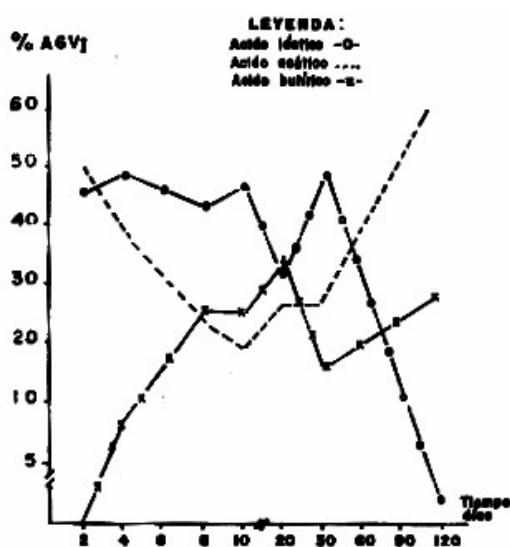


Fig. 4. Proporciones de los ácidos presentes en el ensilaje.

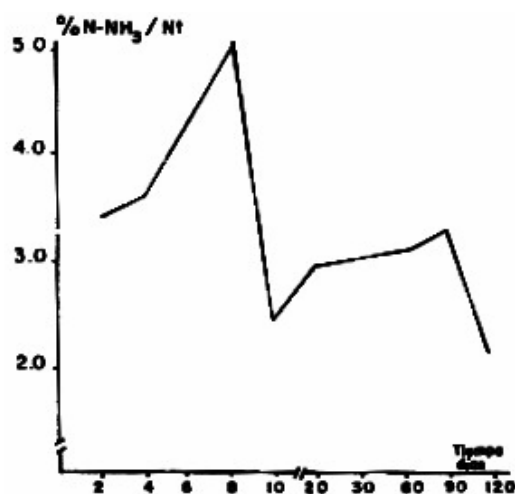


Fig. 5. Contenido de N-NH₃ en ensilaje de CRA-265.

DISCUSION

El bajo contenido de MS que presentó el ensilaje estudiado, favoreció el desarrollo bacteriano y la fermentación de los glúcidos solubles presentes en el material, lo cual actúa en detrimento de la calidad de la conservación; sin embargo la PB sufrió poca variación durante el ensilaje, lo que indica una actividad limitada de las proteasas vegetales (Gouet, Fatianoff, Zelter, Durand y Chevalier, 1965), que son inhibidas en forma general por la acidez del medio donde actúan.

Coincidiendo con los resultados de otros autores (Gouet *et al.*, 1965; Woolford, Honig y Fenlon, 1979), el crecimiento de las bacterias ácido lácticas fue rápido en los primeros días, al disponer estos de gran cantidad de nutrientes para su desarrollo debido a la plasmólisis celular. El desenvolvimiento posterior de este grupo de bacterias se ajusta a los resultados obtenidos por Pedersen, Olsen y Gultormsen (1973), con la diferencia de que la concentración de estos microorganismos se mantuvo constante desde los 30 hasta los 90 días y declinó posteriormente. Por el contra-

rio, las bacterias entéricas se desarrollaron con mayor fuerza a los 2 días de conservación, debido a que el pH del medio se encontraba por encima de 4,2. De acuerdo con los estudios realizados por Gross (1969), estas bacterias no son capaces de crecer cuando el pH es bajo, lo que se corresponde con nuestros resultados.

Se ha señalado que las levaduras pueden desarrollarse en el medio durante los 120 días de conservación, porque tienen la capacidad de sobrevivir a pH bajos, utilizan fuentes de carbono sencillas y crecen en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, indistintamente (Pelczar y Reid, 1970). Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por Woolford y col. (1979), Hardy (1980) y Gouet, Luis y Gouet (1984) en ensilajes de diferentes especies.

La disminución del pH a valores cercanos a 4,0 a partir del cuarto día de conservación, está fundamentada por el rápido crecimiento de las bacterias ácido lácticas y la producción elevada de ácido láctico. El incremento del pH a partir de los 60 días estuvo estrechamente relacionado con la degradación del ácido láctico formado y el aumento en la concentración de los ácidos acético y butírico, que aportan menor acidez al medio (Brewster, 1966).

La evolución de los ácidos grasos dependió del desarrollo de los microorganismos presentes en el ensilaje. El predominio de fermentaciones lácticas al inicio del proceso de conservación ha sido detectado también en otros pastos tropicales (Luis y Ramírez, 1985), en los cuales se produjo igualmente una inversión en la orientación de la fermentación hacia la producción de ácido acético, que estuvo influenciada por el bajo contenido de MS del pasto (Catchpoole y Henzell, 1971).

La formación de ácido butírico tuvo su origen en la proliferación de los clostridios, que utilizaron el ácido láctico como

fuerza de energía. La producción de este ácido en ensilajes tropicales también fue encontrada por Aguilera (1975) y Gouet (1979). Las proporciones de los ácidos grasos, confirman que la presencia de los microorganismos homofermentativos, heterofermentativos, levaduras y bacterias clostrídicas interactúan entre sí para producir este tipo de fermentación.

La aparición del $N-NH_3$ estuvo relacionada con la actividad enzimática vegetal y bacteriana que favoreció la amonificación durante los 8 primeros días, resultados que son similares a los obtenidos por Gouet y Fatianoff (1964); mientras que el comportamiento posterior del $N-NH_3$ está relacionado con la presencia en el medio de los clostridios.

Los resultados de este trabajo sirven para reafirmar lo planteado por Matchpoole y Henzell (1971) y por Luis y Ramírez (1986) acerca de que los pastos tropicales presentan una fermentación acética y no láctica durante la conservación, y que el bajo contenido de MS favorece la proliferación de los clostridios, productores de ácido butírico y de amoníaco, que no se controlaron con la acidez del medio.

Teniendo en cuenta estos resultados es importante hacer una correcta selección del forraje a ensilar, elevando de ser necesario el contenido de MS que es un factor determinante en la fermentación de los ensilajes, así como propiciar fermentaciones adecuadas mediante la utilización de aditivo biológico.

REFERENCIAS

- AGUILERA, G.R. 1975. *Cuban J. Agric. Sci.* 9:227
- AOAC. 1960. Official Methods of Analysis (9th ed.) Washington D.C. Association of Official Agricultural and Chemist
- BAULE, A. & WEISSBACH, F. 1963. Zeitschrift für Land- und Forstwirtschaft 9. Bund Heft 6
- BREWSTER, R.Q. 1966. Química orgánica. Versión española de Carlos María

- Scattini. 2da. ed. Ed. Revolucionaria. La Habana, Cuba
- CATCHPOOLE, V.R. & HENZELL, E.F. 1971. *Herb. Abstr.* 41:213
- CONWAY, E.J. 1957. Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood. London
- GOUET, Ph. 1979. Les bactéries des ensilages. Cycle approfondé d'alimentation animale. INRA. Theix. Francia
- GOUET, Ph. & FATIANOFF, NATHALIE. 1964. *Ann. Inst. Pasteur.* 107:711
- GOUET, Ph.; FATIANOFF, NATHALIE; ZELTER, S.Z.; DURAND, MICHELLE & CHEVALIER, R. 1965. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 5:79
- GOUET, Ph.; LUIS, LISSETTE & GOUET, JOSETTE. 1984. Effects de l'inoculation de ferments lactiques sur la conservation d'ensilage de Dactyl. CRZV. Theix, Francia
- GROSS, F. 1969. Silos y ensilados. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p. 1
- HARDY, CLARA. 1980. Contribución al estudio del ensilaje de grano de Sorgho, con gran humedad. Tesis de revalidación del grado de C.Dr.C. ISCAH. La Habana
- HEYDRICH, MAYRA & CRUZ, M. 1978. Folleto de prácticas de Microbiología General. Impresión "André Voisin". Cuba. Pág. 39
- LUIS, LISSETTE & RAMIREZ, MARISOL. 1985. *Pastos y Forrajes.* 8:144
- LUIS, LISSETTE & RAMIREZ, MARISOL. 1986. *Pastos y Forrajes.* 9:147
- THE OXOID MANUAL, 1976. Third edition (revised) published by Oxoid Limited. Hampshire, UK
- PEDERSEN, T.A.; OLSEN, R.A. & GUTTORMSEN, D.M. 1973. *Acta Agric. Scand.* 23:109
- PELCZAR, M.J. & REID, R.D. 1970. Microbiología. 2da. ed. Ed. del Castillo. España. Pág. 211
- WOOLFORD, M.K. HONIG, H. & FENLON, J.S. 1979. *Das Wirtschaftseigene Futter.* 25:158