

ESTUDIO DE LOS PRINCIPALES GRUPOS
DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LOS ENSILAJES
DE PASTO ESTRELLA JAMAICANO (*Cynodon nlemfuensis*)
Y SU RELACION CON LOS PARAMETROS BIOQUIMICOS

Lisette Luis y Marisol Ramírez

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

Para estudiar la cinética de los principales microorganismos, así como los diferentes ácidos grasos volátiles que se forman al ensilar pasto estrella jamaicano (*Cynodon nlemfuensis*), se utilizó un forraje de 6 semanas de rebrote, fertilizado a razón de 60 kg/ha/corte. Como unidades experimentales se emplearon silos tipo Cullitson de 200 g de capacidad, con tiempos de apertura: 2, 4, 6, 8, 10, 30, 60, 90 y 120 días. Las enterobacterias disminuyeron gradualmente hasta desaparecer a los 6 días de conservación, mientras que las levaduras lo hicieron a los 10 días, para incrementarse a partir de este tiempo y mantenerse durante todo el período estudiado en concentraciones mayores de 10^5 /g de MS. El pH fluctuó de acuerdo con el predominio de las concentraciones de los ácidos láctico y acético. Se concluye que las levaduras fueron las responsables de la inestabilidad y de las altas concentraciones de ácido acético encontradas después de los 10 días, en detrimento del ácido láctico originalmente formado.

Palabras clave: *Pasto estrella jamaicano, ensilaje, microorganismos*

El desarrollo de los microorganismos que participan en la fermentación durante el proceso de ensilaje está influenciado por numerosos factores, entre los cuales podemos citar: el tipo de pasto, las condiciones de fabricación y el tipo de aditivo utilizado. En los pastos tropicales este aspecto ha sido poco estudiado (Catchpoole y Henzel, 1971), por lo que el objetivo de este trabajo fue conocer el comportamiento de los diferentes grupos microbianos que participan en el proceso y su relación con los parámetros bioquímicos que inciden sobre la calidad del material conservado.

Para la realización de esta experiencia se seleccionó el pasto estrella jamaicano (*Cynodon nlemfuensis*), por presentar buen establecimiento y rápido desarrollo, buena producción de MS (Pereira, Paretas y Ramos, 1982) y otras características que han avalado su extensión a las áreas de producción y la utilización de sus excedentes para la fabricación de ensilaje.

Con el estudio de la microflora presente en el material conservado sentamos las bases para obtener ensilajes de más alta calidad, y a la vez dirigimos nuestro trabajo hacia la obtención de cepas que utilizadas como aditivo biológico, favorezcan una fermentación eficaz.

MATERIALES Y METODOS

Tratamiento y diseño. Se estudió la cinética de los 3 principales grupos de microorganismos presentes en el material ensilado y su relación con los parámetros bioquímicos; se utilizó el pasto estrella jamaicano (*Cynodon nlemfuensis*), con 6 semanas de rebrote y fertilización de 60 kg N/ha/corte.

Se muestreó la hierba fresca (t_0) y los tiempos 2, 4, 6, 8, 10, 30, 60, 90 y 120 días de apertura del silo. Para cada dilución fueron utilizadas 4 réplicas. El ensilaje fue confeccionado en el mes de marzo de 1983.

El material a ensilar fue cortado a mano a una altura de 10 cm, e introducido en bolsas de polietileno no estériles. El troceado se realizó en una máquina troceadora estacionaria, y se logró alcanzar fracciones de 2 cm aproximadamente.

En silos tipo Cullitson de 200 g de capacidad fue depositada la hierba y apisonada posteriormente con mortero de mano para la extracción máxima del aire intersticial; un tapón de goma horadado con su válvula Bunsen sirvió para cubrir la superficie externa del ensilaje, y a la contratapa de metal sellada con parafina hermetizó los silos, que fueron colocados en lugar oscuro, ventilado y seco hasta el momento de la apertura.

Para la realización de los análisis microbiológicos, se confeccionó una solución con 30 g del material fresco o ensilado y 270 ml de solución salina al 0,9% estéril, macerada a 3 000 rpm.

Esta solución representó la dilución 10^{-1} y a partir de ella fueron confeccionadas las siguientes hasta 10^{-8} . Cada dilución fue replicada 2 veces, efectuándose 2 siembras con cada una de ellas, lo que totalizó 4 mediciones. Un ml de la dilución fue inoculado en cada placa.

Métodos analíticos. El conteo de microorganismos viables se efectuó en cámara contadora de colonias y se utilizó el método de dilución y plaqueo (placa vertida) postulado por Heydrich y Cruz (1978). Los medios de cultivo utilizados para realizar el conteo fueron preparados a partir de sus componentes según el Oxoid Manual (1976); medio RBA (Red Bile Agar) para determinar bacterias coliformes; medio BLA (Buffel Yeast Agar) para aislar mohos y levaduras y medio MRA (Rogosa Agar) para aislar bacterias lácticas.

El proceso de incubación se realizó siguiendo este esquema:

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

Los parámetros bioquímicos y bromatológicos estudiados fueron: la MS, determinada 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 MS promedio encontrada en los ensilajes fue de 32,17%, mientras que el contenido de nitrógeno total resultó de 1,34%.

El comportamiento de los microorganismos estudiados en los ensilajes y su cinética se muestra en la figura 1.

El grupo de las enterobacterias, que al inicio se encontraban en cantidades apreciables (10^5 /g MS), evolucionó de forma decreciente hasta desaparecer a los 6 días de efectuado el ensilaje.

El grupo de los mohos y levaduras, de una concentración inicial mayor que 10^4 /MS evolucionó también decreciendo, pero solamente hasta los 10 días en que alcanzó una concentración igual a 0, e inmediatamente se incrementó hasta alcanzar una concentración final mayor que 10^5 /g MS.

Por su parte, el grupo de los lactobacilos presentó un rápido ascenso después del segundo día de conservación y alcanzó una concentración mayor que 10^6 /g MS. Presentó un máximo entre los 6 y 3 días con concentraciones superiores a 10^7 /g MS, y se estabilizó a partir de este tiempo a una concentración superior a 10^5 /g MS durante todo el período.

El ácido láctico mostró un incremento durante los primeros 6 días de conservación, para luego disminuir rápidamente a los 8 días, elevarse a los 10 y volver a caer hasta el tiempo 30; la fase de estabilización se logró entre los 90 y 120 días. Mientras, el ácido acético tendió a incrementarse en la medida en que aumentaba el tiempo de conservación, a pesar de presentar 2 caídas a los 10 y 90 días.

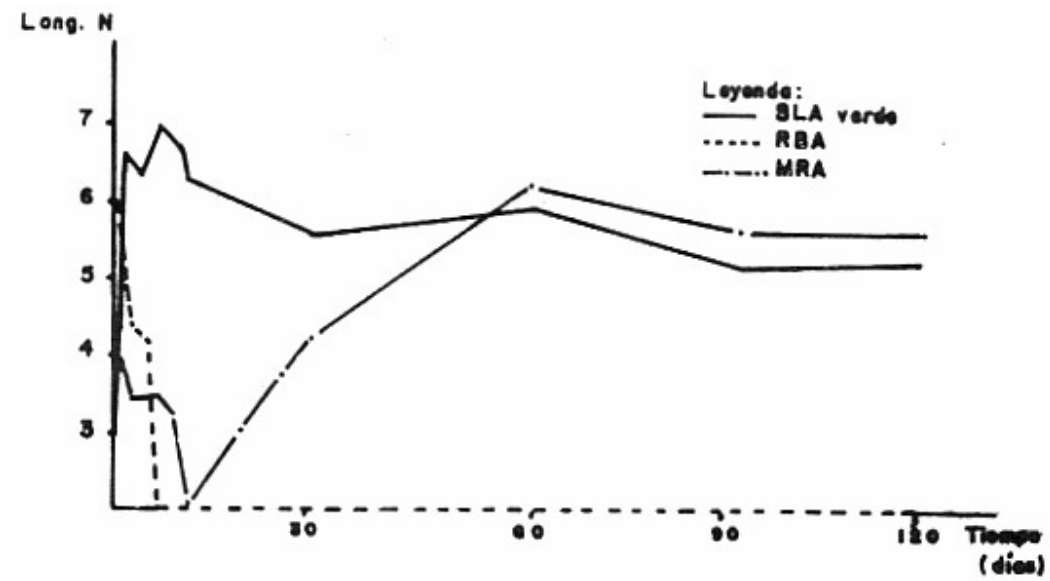


Fig. 1. Cinética de los microorganismos estudiados en los ensilajes de pasto estrella jamaicano.

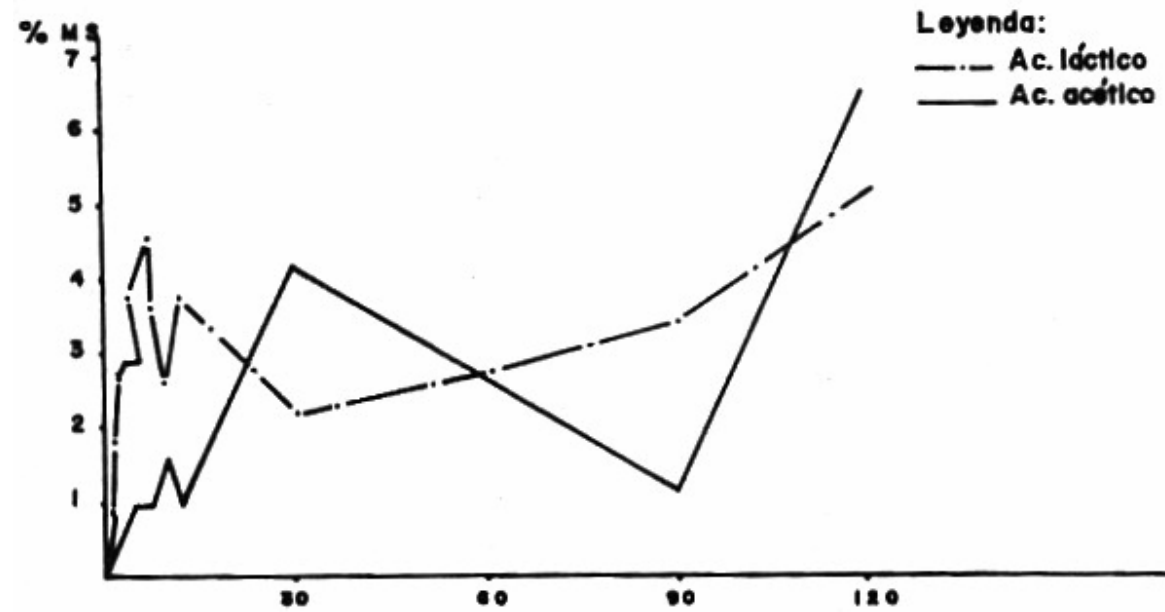


Fig. 2. Evolución de los principales ácidos formados en los ensilajes de pasto estrella jamaicano.

El ácido butírico no fue detectado en ninguno de los tratamientos estudiados.

Las proporciones porcentuales de los ácidos acético y láctico mostraron dos períodos del curso de las fermentaciones bien definidos (fig. 3); donde el predominio fue del ácido láctico hasta los 10 días. A partir de este tiempo de apertura encontramos un predominio del ácido acético a 30 y 120 días, un equilibrio entre ambos a los 60 y un predominio del ácido láctico a los 90.

Estos resultados concuerdan con las fluctuaciones encontradas en el pH de los ensilajes (fig. 4), en el cual después de un ligero incremento a los 4 días se produjo un brusco descenso.

En correspondencia con la cantidad de ácido láctico y acético, a partir de los 30 días ocurrió una nueva disminución hasta los 90, momento a partir del cual se observó un ligero ascenso hasta el final del período estudiado.

Al analizar la evolución del N amoniacal de los ensilajes (fig. 5) se apreció una rápida amoniogénesis entre el segundo y cuarto día, para ir decreciendo con igual intensidad hasta los 10 días. Se reinició a los 20, para alcanzar a partir de este tiempo valores casi estables. A los 120 se registró otro descenso.

DISCUSION

La composición química encontrada en los ensilajes de pasto estrella jamaicano se consideró adecuada para que se produjera una buena fermentación con ausencia de microorganismos del grupo de los Clostridium, debido a que cuando los ensilajes tienen 33% de MS o más no deben presentarse fermentaciones atribuibles a este tipo indeseable de bacterias (Demarquilly, 1973). Igualmente, el contenido de Nt se consideró aceptable para nuestros pastos (Cáceres, Esperance y Echevarría, 1983).

En la flora epifítica se encontraron representados los tres principales grupos de microorganismos presentes en el forraje verde, y aunque en este estudio no se incluyeron los Clostridium, estos no lograron proliferar.

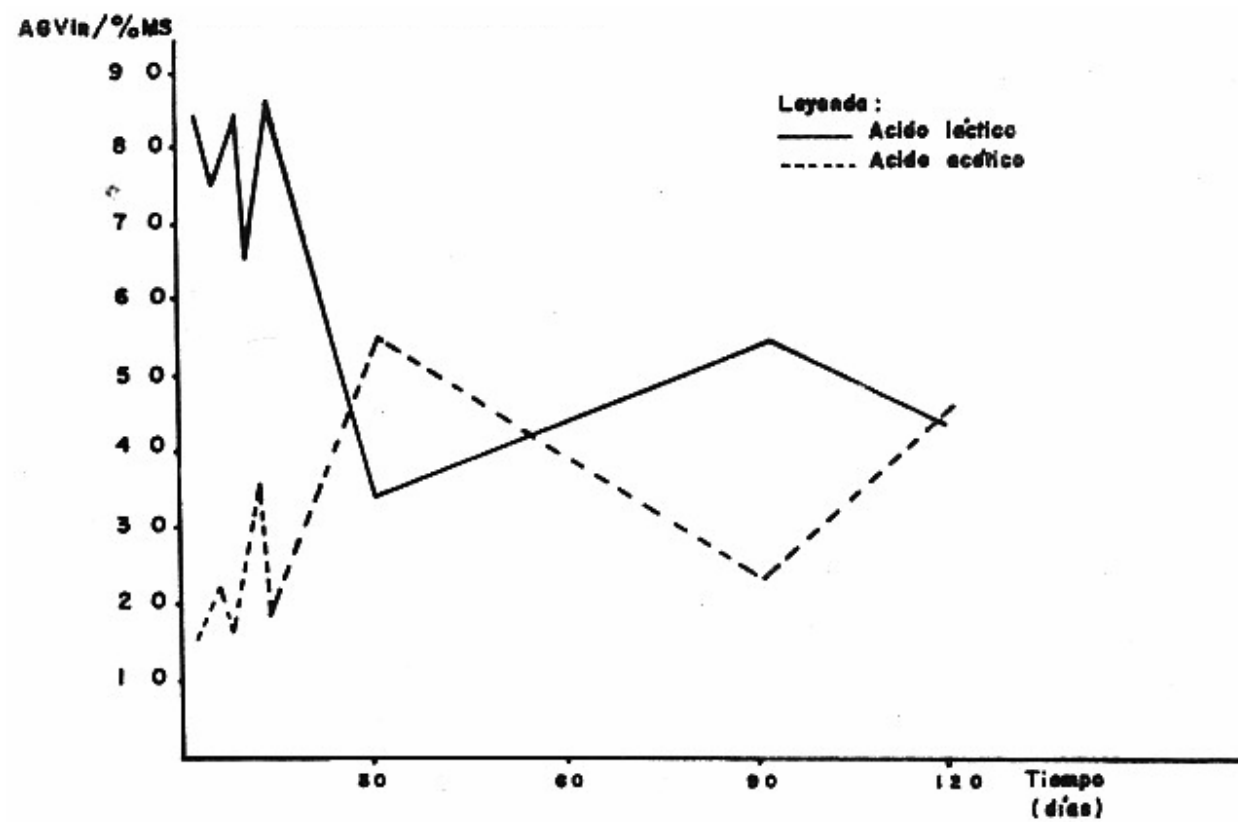


Fig. 3. Evolución de los principales ácidos formados en los ensilajes de pasto estrella jamaicano.

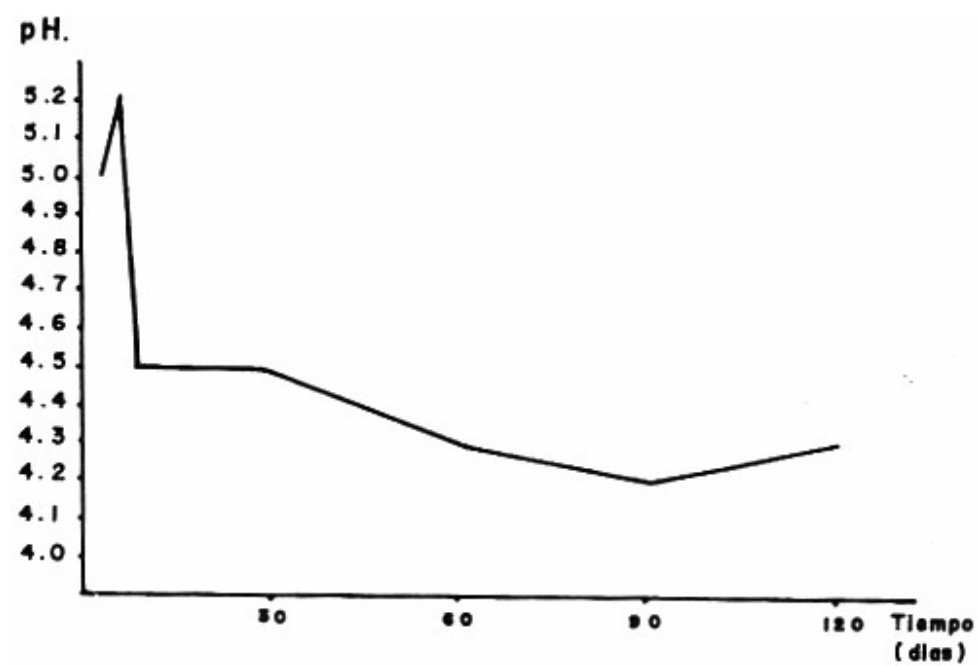


Fig. 4. pH de los ensilajes de pasto estrella jamaicano.

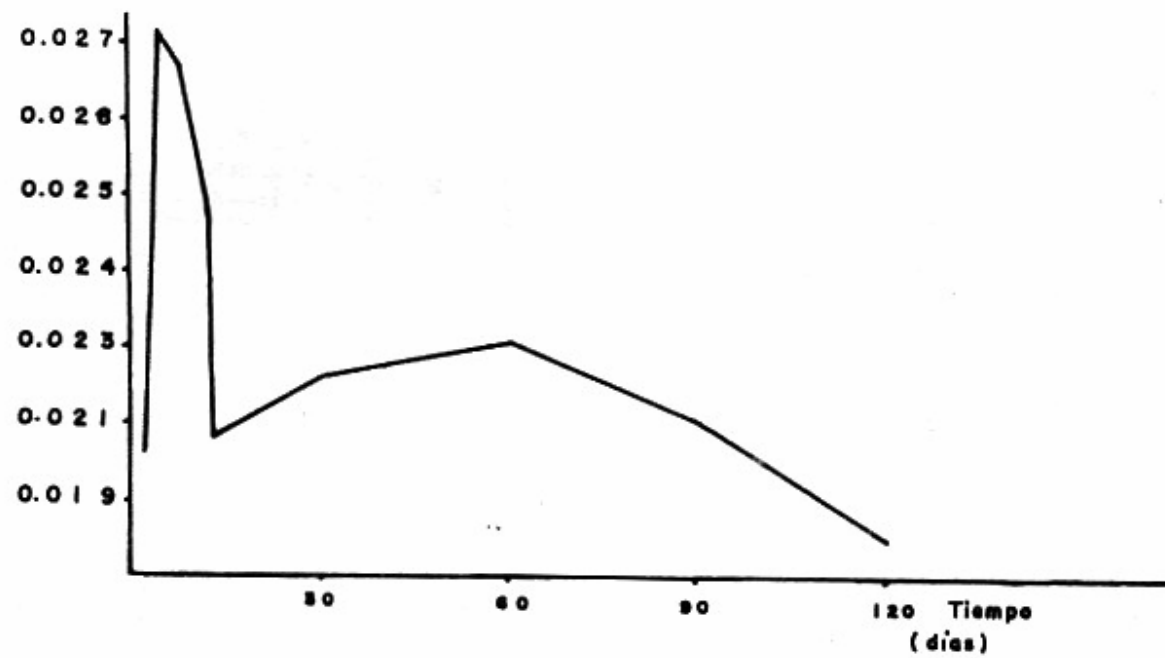


Fig. 5. Evolución del N-NH en los ensilajes de pasto estrella jamaicano.

La evolución descendente de las enterobacterias concuerda con lo reportado por Barnett (1954) y Gouet, Girardeau y Riou (1979), los cuales atribuyeron el comportamiento a que este tipo de bacteria se ve inhibido cuando el pH desciende por debajo de 4,5. Ello coincide con lo encontrado en esta experimental en la cual a los 6 días se había alcanzado dicho valor y no se detectó la presencia de enterobacterias viables. Estos microorganismos se caracterizan por su habilidad para desaminar y descarboxilar los aminoácidos (Devuyst y Vanbelle, 1964), lo que se puede relacionar con los incrementos de NH_3 encontrados en los primeros días de conservado el material.

Aunque el medio BLA utilizado es capaz de mostrar tanto el desarrollo de los mohos como de las levaduras, los primeros no se detectaron visualmente en los ensilajes, por lo que las colonias contadas pertenecían en su totalidad al grupo de las levaduras.

Según Beck (1978) existen dos tipos de levaduras que permanecen en el ensilaje: un grupo proveniente del suelo, que utiliza preferentemente los azúcares para su desarrollo, y otro grupo que aparece sobre la planta y utiliza los lactatos como fuente de energía. Además, McDonald (1980) planteó que las levaduras pueden usar como fuente de nitrógeno no sólo compuestos orgánicos o inorgánicos, sino también iones amonio.

Estos resultados sugieren que durante la fase descendente de las levaduras, en los primeros días de la fermentación, predominan las del suelo, que utilizan los carbohidratos solubles presentes en la planta y el amoníaco que se produjo por la actividad enzimática de las mismas y de las enterobacterias. Luego, a partir de los 10 días de la nueva fase de desarrollo, predominan las levaduras, que utilizan el lactato como fuente de energía y los aminoácidos de la plantas, lo cual explicaría a su vez el incremento inicial de amoníaco hasta el cuarto día, su disminución hasta los 10 y su posterior incremento hasta los 30.

El acelerado desarrollo de las bacterias lácticas con su máxima concentración a los 6 días y su posterior estabilización, coinciden con lo reportado por Pedersen, Olsen y

Guttormsen (1973) y Gouet *et al.* (1979). No se encontraron disminuciones iniciales de este tipo de bacterias, como ha sido reportado por Celanie (1982).

La evolución bioquímica de los ácidos acético y láctico hace pensar en una confirmación de la hipótesis originalmente planteada, ya que después de un inicio de fermentaciones predominantemente lácticas con producción mínima de ácido acético, atribuibles en primera instancia a la presencia de bacterias heterolácticas y en forma secundaria a las enterobacterias y levaduras, se observó que a partir del décimo día los lactatos ya formados comenzaron a disminuir, para incrementarse la concentración de ácido acético, lo cual se correspondió con un incremento del pH en concordancia con la menor acidez que induce este ácido en relación con el láctico (Brewtter, 1966).

Esta elevación del pH favoreció un nuevo desarrollo de las bacterias lácticas, volviendo a predominar a los 90 días, y se correspondió con una nueva disminución en el pH. Sin embargo, no podemos considerar que se haya logrado una estabilidad final de estos ensilajes, ya que a los 120 días encontramos un nuevo predominio del ácido acético sobre el ácido láctico, lo cual se reflejó en un incremento del pH.

Analizando lo hasta aquí expuesto, podemos concluir que para el pasto estrella jamaicano el ácido predominante al final del período estudiado fue el ácido acético, y que después de los 30 días hay un cambio en la orientación de las fermentaciones, coincidiendo este comportamiento con lo reportado por Aguilera (1975), aunque en nuestro caso no se incorporaron fermentaciones butíricas. A la luz de los estudios microbiológicos realizados, la presencia de grandes concentraciones de ácido acético está relacionada con la actividad metabólica de las levaduras, las cuales se encuentran en cantidades similares a las bacterias lácticas, existiendo una competencia entre ambos grupos de microorganismos.

El comportamiento irregular en el predominio de uno u otro ácido provocó el aumento de la inestabilidad del ensilaje, como reflejo de la actividad microbiana que se desarrolló durante la conservación.

En estudios posteriores se determinará si los resultados aquí expuestos constituyen una característica particular del pasto estrella jamaicano o si, por el contrario, pueden extenderse de forma general al resto de los pastos de nuestro país.

SUMMARY

A forage of six weeks of regrowth and 60 kg N/ha/cut were used in order to study the kinetics of the main micro-organism as well as the individual volatile grasses acids which are formed during the conservation of estrella jamaicano grass (*Cynodon nlemfuensis*). Cullitson's silo of 200 g of capacity with opening time of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 30, 60, 90 and 120 days were used as experimental unit. The enterobacterias went down gradually up to disappear when six days of conservation, and the yeasts at 10 days. From this time on they increased and remained in concentrations higher than 10^5 /g of DM during all the studied period pH fluctuated according to the predominance of lactic and acetic acid concentrations. It was concluded that yeasts were the responsible for instability and high acetic acid concentrations found after 10 days, in detriment of the lactic acid originally formed.

REFERENCIAS

- AGUILERA, G.R. 1975. **Cuban J. Agric. Sci.** 9:227-235
- AOAC. 1960. Official Methods of Analysis (9th ed.). Washington D.C. Association of Official Agricultural Chemists
- BARNETT, A.J. 1954. Silage fermentation. Academic Press. Inc. New York

- BAULE, A. & WIESSBACH, F. 1963. Zietseif f. landre versuch und untersschurg wesen 9. Bund Helft 6
- BECK, Th. 1978. In fermentation of silage -a review (M.E. McCullough ed.) National Feed Ingredients Assoc. Iowa. 61-115
- BREWTTER, R.O. 1966. Química orgánica. Versión española de Carlos María Scattini. 2da. ed. La Habana. Edición Revolucionaria
- CACERES, O.; ESPERANCE, M. & ECHEVARRIA, N. 1983. Metodología para la fabricación de heno. **ACPA**. 1/83. Cuba. 41-44
- CATCHPOOLE, V.R. & HENZELL, N.W. 1971. **Herb. Abst.** 41:213-221
- CELANIE, N. 1982. Etude de l'evolution microbiologique et des caracteristiques fermentaires das ensilages de canne a sucre, de sorgho et de pangola en climat tropical humide. Teses. Université Pierre et Marie Curie. Paris 6
- CONWAY, E.J. 1957. Microdifusion analisis and volumetric error. Crosby Lockwood. London
- DEMARQUILLY, C. 1973. **Ann. Zootechn.** 22:1-35
- DEVUYST, A. & VANBELLE, M. 1964. Les bases scientifiques de l'ensilage. Centre de Recherches Zootechniques de l'Université de Louvain a Lovenjoll. Belgique. Vol. XII, 2da. Serie, No. 1
- GOUET, Ph.; GIRARDEAU, J.P. & RIOU, Y. 1979. La flore microbienne des ensilages. I. Ecologic microbienne des fourrages verts et des ensilages. Bull. Techn. CRZV. Theix INRA (36) 25-30
- HEYDRICH, M. & CRUZ, M. 1978. Folleto práctica de Microbiología general. Impresión "André Voisin". Cuba. 39-43
- MCDONALD, P. 1980. Silage fermentation. Occasional Symposium No. 11 (Thomas, C. (Editor)

PEDERSEN, T.A.; OLSEN, R.A. & GUTTORMSEN, D.M. 1973. ***Acta Agricultural Scandinava***. 23:109-120

PEREIRA, E.; PARETAS, J.J. & RAMOS, N. 1982. Resúmenes V Seminario Científico Técnico. EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba

THE OXOID MANUAL. 1976. Third edition (Revised). Published by Oxoid Limited. Wade Rood Baingstoke. Hampshire R. 624 OPW