

CINETICA DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE MICROORGANISMOS EN UN ENSILAJE DE BUFFEL FORMIDABLE

Lisette Luis y Marisol Ramírez

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

En un ensilaje de buffel formidable se realizó el estudio de la cinética de tres de los principales grupos de microorganismos presentes en el material conservado, así como la relación entre ellos y los parámetros fermentativos que influyeron en la calidad del mismo. A partir de los 10 días de iniciado el proceso, ocurrió un cambio en la orientación de la fermentación, con predominio del ácido acético. Este cambio en la fermentación estuvo relacionado con el desarrollo de las levaduras, bacterias entéricas y ácido lácticas, durante todo el proceso, y no pudo lograrse la estabilización del pH. La producción de ácido butírico fue elevada al final de la conservación, infiriéndose con ello la presencia de bacterias del grupo de las clostrídicas.

Palabras clave: *Buffel formidable, microorganismos, ensilaje*

The kinetic of three of the main microorganism groups located on the conserved material, as well as the relationship among them and the fermentative parameters that influence on silage quality; were studied on a formidable buffel silage. A change on the fermentation orientation occurred ten days after the process had begun with a predominance of the acetic acid. This fermentation change was related with yeast development, enteric bacteria and lactic acid during all the process where no pH stabilization could be obtained. When the conservation was concluded the butyric acid production was high it meant the presence of bacteria from the clostridium group.

Key words: *Buffel grass cv. Formidable, microorganisms, silage*

La producción de ensilajes de alta calidad es un objetivo que persigue el desarrollo acelerado de la ganadería en nuestro país, por lo que se hace necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos de conservación y el rol

importante que dentro de este juegan los microorganismos, máximos responsables de la fermentación.

En el proceso de conservación en forma de ensilaje, se producen fermentaciones que deben estabilizar la masa

vegetal y que no son más que el producto de la actividad metabólica de las bacterias y de las enzimas de la planta.

La calidad del material ensilado va a depender: de la rapidez y el grado de las especies que componen la microflora y del sustrato que servirá para su desarrollo.

El objetivo fundamental de este trabajo fue conocer el desarrollo de los diferentes grupos de microorganismos en dependencia de las condiciones del ensilaje, y su relación con los cambios bioquímicos registrados en el material ensilado después de transcurrido todo el proceso, para lo cual se utilizó el buffel formidable (*Cenchrus ciliaris* cv. Formidable).

MATERIALES Y METODOS

Tratamiento y diseño. Para estudiar la cinética de tres de los principales grupos de microorganismos presentes en el material ensilado, así como su relación con los parámetros bioquímicos, fue utilizado el buffel el formidable (*Cenchrus ciliaris*), con 6 semanas de rebrote y fertilizado a razón de 60 kg N/ha/corte. Este presentó un contenido de proteína cruda entre 9,7 y 13,2% y una digestibilidad de la MS promedio de 58,3%.

Las muestras fueron recolectadas de un ensilaje confeccionado en diciembre de 1983 a los 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 días.

La experiencia se realizó en silos tipo Cullitson de 200 g de capacidad aproximadamente.

Los análisis microbiológicos se realizaron macerando 30 g de material fresco o ensilado, con 270 ml de solución salina estéril al 0,9%. A partir de esta solución madre fueron confeccionadas las dilu-

ciones hasta 10^{-8} . Cada dilución fue replicada dos veces y se realizaron dos inoculaciones con cada una de ellas.

Métodos analíticos. El conteo de microorganismos viables se efectuó en cámara contadora de colonias y se utilizó el método de dilución y plaqueo descrito 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), medio BLA (Buffel Yeast Agar) y medio MRA (Rogosa Agar).

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

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

Se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos y bromatológicos: 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) y producción de amoníaco, por el método de microdifusión de Conway (1957).

RESULTADOS

Según los análisis realizados, el contenido de MS del ensilaje fue alto (40,2%).

La figura 1 refleja los cambios ocurridos en la flora microbiana presente en el ensilaje. El contenido de levaduras mostró un ligero incremento hasta el octavo

día de conservación, a partir del cual hubo una caída brusca primero y más lenta después, hasta los 30 días. Durante los siguientes períodos de análisis se

produjeron incrementos en la concentración de estos microorganismos, los cuales alcanzaron a los 120 días una población de 10^4 /g de MS.

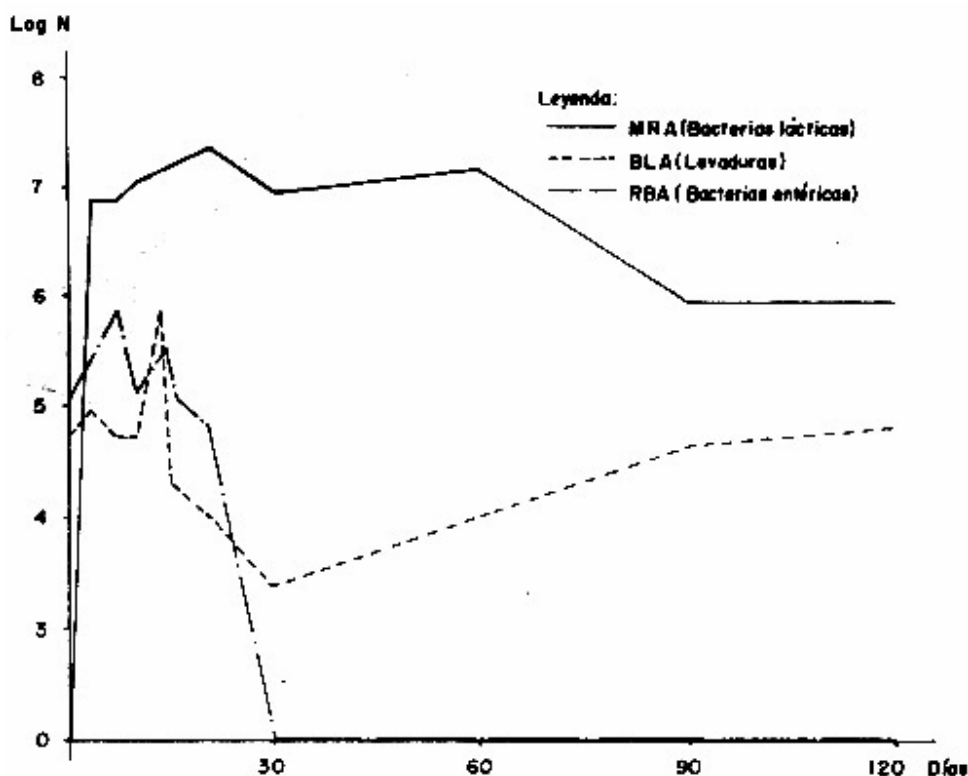


Fig. 1. Transformaciones en el desarrollo de los diferentes grupos de microorganismos.

Un rápido crecimiento de las bacterias lácticas pudo apreciarse al segundo día de iniciada la experiencia, pasando de una concentración inicial de 0 a 10^6 /g de MS, la cual continuó incrementándose ligeramente hasta los 20 días de conservación, donde se alcanzó el máximo contenido en células (10^4 /g MS).

Una ligera estabilidad en la concentración de microorganismos lácticos se detectó entre los 20 y los 60 días y a partir de ese momento se produjo un descenso a 10^5 /g MS, manteniéndose constante hasta el final del proceso.

En el desarrollo de las enterobacterias se registraron dos incrementos en la concentración a los 4 y 8 días de iniciado el proceso, disminuyendo gradualmente, hasta desaparecer a los 30 días.

Las variaciones del pH, ocurridas durante el proceso de ensilaje, aparecen reflejadas en la figura 2. De un valor inicial de 6,0, el pH comenzó a disminuir hasta los 10 días en que se detectó su menor valor (4,8). A partir de entonces se incrementó nuevamente hasta 4,9, manteniéndose durante el período siguiente alrededor de este valor.

Los ácidos grasos volátiles que con más frecuencia aparecieron en los ensilajes se muestran en la figura 3. En el transcurso de los primeros 10 días hubo predominio de la concentración del ácido láctico sobre el ácido acético, que también se produjo, pero en menor cantidad. Después de los 10 días hubo una inversión en dicha relación, y fue el ácido acético el que más altos valores alcanzó; al final del proceso se igualaron ambas concentraciones. La producción de ácido butírico se registró a los 10 días de conservación, la que aumentó gradual-

mente. Su concentración fue similar a la de los ácidos acético y láctico, y ligeramente más elevada al concluir la experiencia. Las proporciones entre los tres ácidos (fig. 4) reafirman estos resultados. Al inicio, el por ciento de ácido láctico sobrepasó el de los restantes; no obstante, esta relación sólo se mantuvo hasta cerca de los 10 días, predominando, a partir de esa fecha, el ácido acético exceptuándose a los 120 días, donde hubo un ligero predominio de las fermentaciones butíricas.

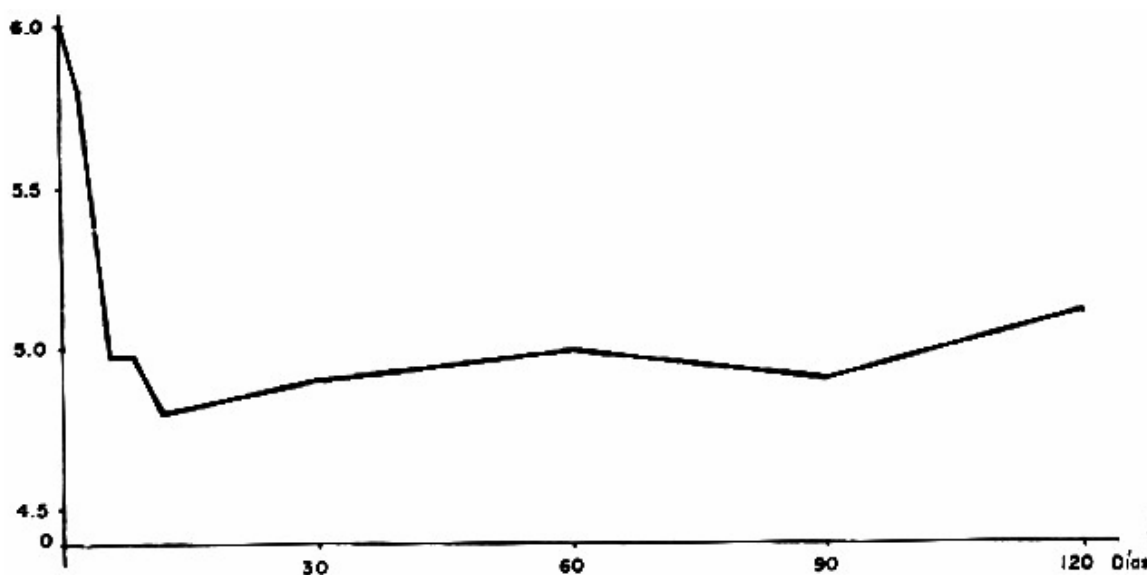


Fig. 2. Variaciones en el pH del medio.

La producción de $N-NH_3$ sufrió ligeras variaciones durante los primeros 30 días del ensilaje, aumentando y disminuyendo alternativamente (fig. 5); a los 60 días se detectó un aumento en la concentración del $N-NH_3$, que permaneció constante hasta los 90 días, y alcanzó al final del proceso el valor más elevado.

DISCUSION

Cuando la tasa de MS es elevada se produce una inhibición de la fermenta-

ción, atenuándose las reacciones de transformación y degradación de aminoácidos y aminos libres, a la vez que se produce una disminución de la amonio-génesis. El pH mantiene niveles elevados debido a la producción retardada de ácido láctico (Gouet y Tatianoff 1964; Gouet, 1970). De acuerdo con los efectos provocados por los altos contenidos de MS de la masa ensilada, debíamos esmerar un producto conservado de buena calidad; sin embargo, no fue así.

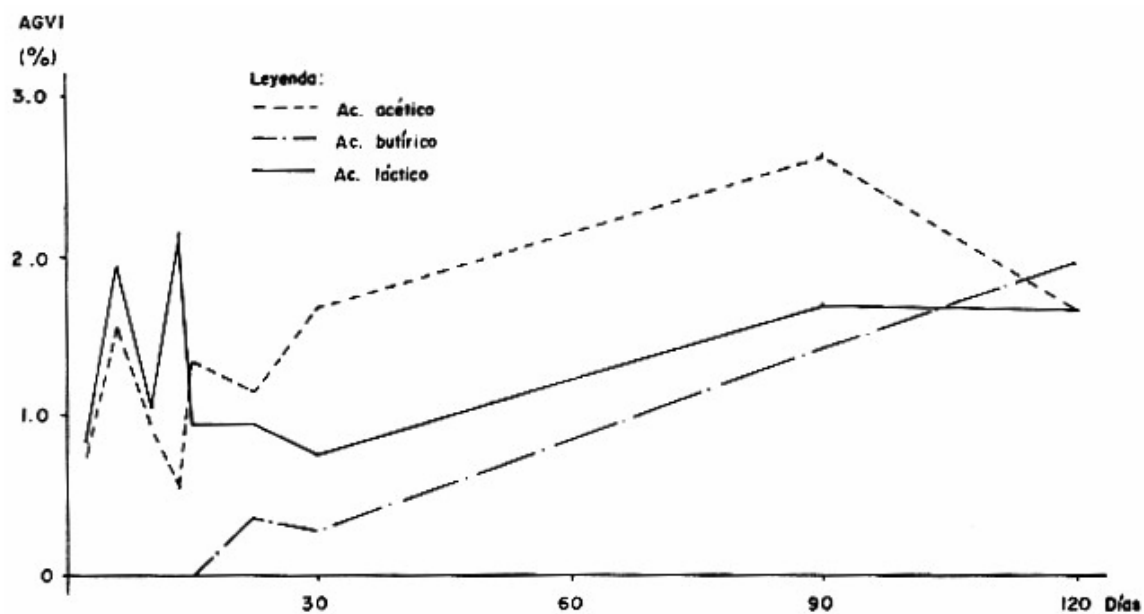


Fig. 3. Cambio en el contenido de ácidos grasos volátiles.

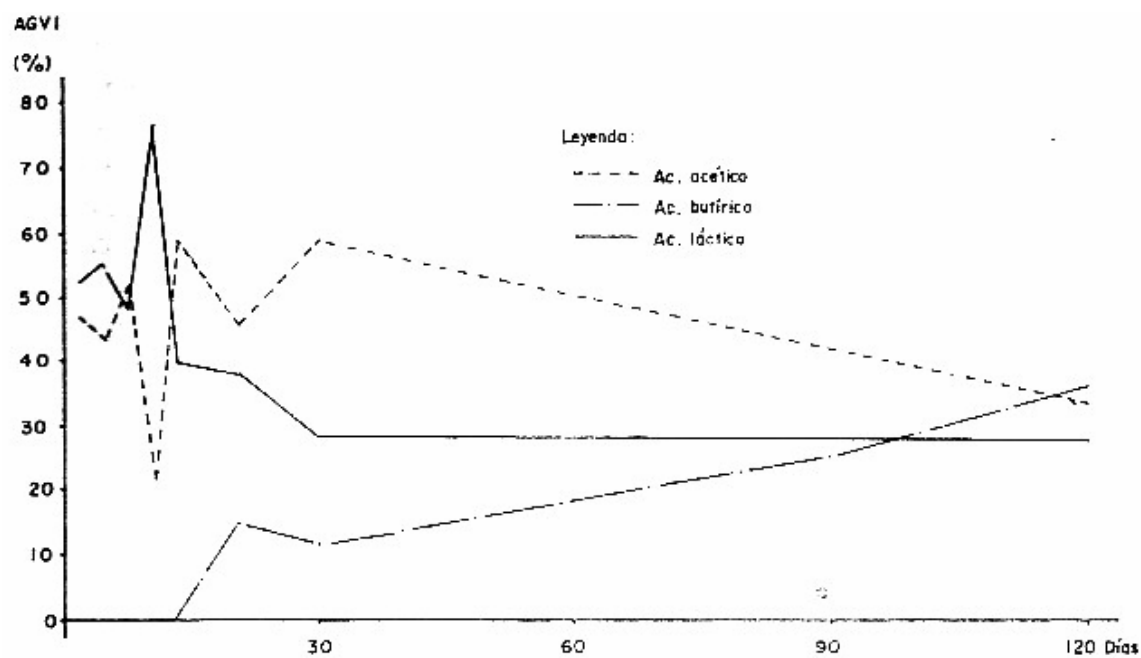


Fig. 4. Proporciones de los ácidos en el ensilaje.

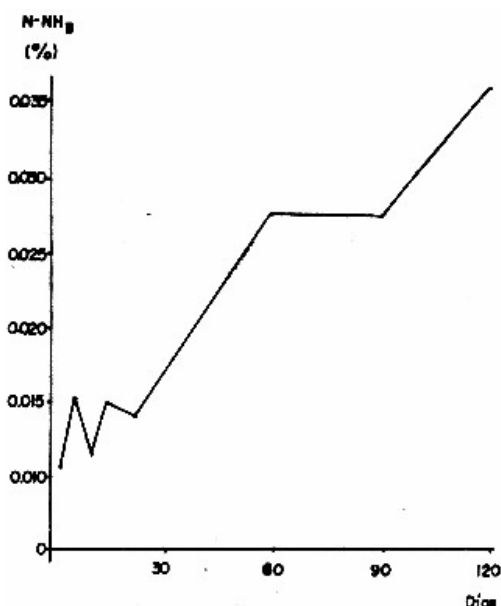


Fig. 5. N-NH₃ producido durante el proceso de conservación de buffel Formidable.

La concentración inicial de levaduras (fig. 1) fue similar a la indicada para la pangola por Celanie (1982). Durante los 8 primeros días del proceso, debido a las condiciones semiaeróbicas que aún subsistían en el ensilaje, las levaduras prevalecían, lo que coincide con lo señalado por Woolford (1972), e incluso se incrementaron. Con posterioridad aunque debía esperarse la desaparición total de este grupo de microorganismos (Barnett, 1957), estos se mantuvieron. La disminución de la concentración a los 20 días pudo deberse a un proceso de adaptación que sufrió esta población microbiana para poder subsistir en condiciones anaerobias estrictas, propiedad que es capaz de desarrollar la misma (Woolford, 1972), o también a la competencia que se establece entre microorganismos. Al finalizar el proceso volvió a alcanzarse una concentración similar a la inicial.

El rápido incremento de los microorganismos lácticos a partir del momento en que se inicia el ensilaje es fácilmente

explicable, al existir en el medio gran disponibilidad de carbohidratos solubles provenientes de la plasmólisis celular, los que son utilizados por estos organismos para su desarrollo. La mayor concentración de los microorganismos de este grupo ácido láctico fue detectada alrededor de los 20 días, lo que coincide con los resultados obtenidos por Barnett (1957).

A partir de este momento y hasta los 60 días se mantuvo casi constante la concentración, comportamiento similar al reportado por Pedersen, Olsen y Gultormsen (1973), con la sola diferencia de que esos autores fijaron el desarrollo máximo de estos microorganismos a los 6 días. Al final del proceso se produjo una ligera declinación en la curva de desarrollo, debido a que dichos microorganismos pueden ser destruidos por el producto de su propio metabolismo (Barnett, 1957).

El crecimiento de las enterobacterias estuvo en correspondencia con los valores alcanzados por el pH, el que ejerció su acción sobre este tipo de microorganismos (Gross, 1969). Las bacterias Gram (-) fueron detectadas en otros pastos hasta los 30 y 60 días de conservado el material en concentraciones de 105/g MS (Gouet, Contrepolis, Bousset, Tatianoff, 1972).

Al igual que en otros pastos tropicales (Aguilera, 1975; Luis y Ramírez, 1985) en este ensilaje se produjo un predominio de fermentaciones lácticas, debido al incremento de las bacterias lácticas durante los primeros días del proceso, lo que indujo la producción del ácido láctico y la disminución del pH. Alrededor de los 10 días de conservación, ocurrió una inversión en la orientación del proceso, predominando la fermentación acética, lo cual puede atribuirse a varios factores como la presencia de microorganismos heterofermentativos productores de ácido láctico y ácido acético, la utilización por parte de los microorganismos homo y

heterofermentativos de los ácidos orgánicos presentes en el material ensilado (Viertainen, 1937; Gouet, 1973), la presencia de bacterias entéricas, principales productoras de este ácido (Barnett, 1957) y de las levaduras que en condiciones anaerobias son capaces de producir también ácido acético (Beck, 1978). La MS elevada produjo un retraso en la formación de los ácidos acético y láctico, disminuyendo sus valores (Gouet, Tatianoff, Zelter, Durand y Chevalier, 1965), lo que impidió una mayor acidificación del medio.

La presencia del ácido butírico como producto de la fermentación es atribuible al grupo de bacterias clostrídicas

(Gouet *et al.*, 1965), responsables de la producción de dicho ácido. El alto contenido de MS debió inhibir el desarrollo de este grupo de microorganismos, debido a su sensibilidad a la presión osmótica; sin embargo, ese efecto no se produjo.

Al igual que en los trabajos realizados por Ohyama, Masaki y Morichi (1972), no se encontró una relación directa entre el desarrollo de las bacterias lácticas y la cantidad de ácido láctico producido, reafirmandose aún más el criterio de la presencia de gran cantidad de microorganismos lácticos heterofermentativos en el ensilaje (Luis y Ramírez, 1985), los cuales producen cantidades importantes de ácido acético y láctico (Gouet, Girardeau y Riou, 1979).

Unido a este criterio, debemos hacer notar que el alto contenido de MS del pasto ensilado no ejerció una influencia importante sobre las enzimas de la planta (Gouet *et al.*, 1965), por lo que las hemicelulosas actúan, liberando las pentosas, lo que repercute en la producción de los ácidos láctico y acético (Gouet *et al.*, 1972)

El crecimiento de microorganismos del grupo clostridium se detectó debido a la producción de ácido butírico y a la presencia de $N-NH_3$, por ser estos los

principales metabolitos obtenidos de su actividad (Hardy, 1980).

Los primeros cambios ocurridos en el contenido de $N-NH_3$ se debieron a la presencia de microorganismos entéricos, que son capaces de desaminar y descarboxilar las proteínas, y a la acción enzimática vegetal, que se incrementa en presencia de microorganismos. El aumento del contenido de $N-NH_3$ que ocurrió a partir del décimo día se debió fundamentalmente a la acción clostrídica, que se produjo a pesar del alto contenido de MS.

De acuerdo con estos resultados podemos reafirmar que durante la conservación de los pastos tropicales hay una tendencia a la producción de fermentaciones acéticas al final del proceso, la que comienza en momentos diferentes en dependencia de la variedad o especie de pasto. En nuestro caso, se detectaron fermentaciones butíricas similares a las registradas por Aguilera (1975).

Esta orientación de la fermentación está íntimamente relacionada con las modificaciones de la microflora presente en el material ensilado, que es capaz de producir por vías diferentes los ácidos grasos volátiles que hemos encontrado. El desarrollo de esta flora microbiana ejerció, por lo tanto, su influencia sobre el pH del medio y no se obtuvo una acidificación mayor.

REFERENCIAS

- AGUILERA, G.R. 1975. *Rev. cubana Cienc. agríc.* 9:235
- BARNETT, A.J. 1957. Fermentación del ensilado. Aguilar, Madrid
- BAULE, A. & WIESSBACH, F. 1963. Zietseiff. landre versuch und untersschurg wesen 9. Bund Heft 6
- BECK, T. 1978. In fermentation of silage a review (M.E. McCullough ed.). National Feed Ingredients Assoc. Iowa. pp. 61
- CELANIE, M. 1982. Etude de l'evolution microbiologique et des caracteristiques

- fermentaires des ensilages de canne á sucre, de sorgho et de pangola en climat tropical humide. Teses. Université Pierre et Marie Curie. Paris 6
- CONWAY, E.J. 1957. Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood. London
- GOUET, Ph. 1970. L'ensilage des fourrages. CRZV. INRA. Exposé présenté á l' A.S.F. Février
- GOUET, Ph. 1973. **Fourrages**. 55:57
- GOUET, Ph. & TATIANOFF, NATHALIE. 1964. **Annales de L'Institute Pasteur**. 107:711
- GOUET, Ph.; TATIANOFF, NATHALIE; ZELTER, S.Z.; DURAND, MICHELLE & CHEVALIER, R. 1965. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.** 5:79
- GOUET, Ph.; CONTREPOIS, M.; BOUSSET, J. & TATIANOFF, NATHALIE. 1972. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.** 12:159
- GOUET, Ph.; GIRARDEAU, J.P. & RIOU, Y. 1979. La Flore microbienne des ensilages. 1. Ecologie microbienne des fourrages verts et des ensilages. CRZV. Theix. INRA. 36:25
- GROSS, F. 1969. Silos y ensilados. Ed. Acribia. Zaragoza, España
- HARDY, CLARA. 1980. Contribución al estudio del ensilaje de grano de sorgho con gran humedad. Tesis de revalidación del grado de C.Dr.C. Cuba
- HEYDRICH, MAYRA & CRUZ, M. 1978. Folleto de prácticas de microbiología general. Impresión "André Voisin". Cuba. Pág. 39
- LUIS, LISETTE & RAMIREZ, MARISOL. 1985. **Pastos y Forrajes**. Revista de la EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. 8:141
- OHYAMA, Y.; MASAKI, S. & MORICHI, T. 1972. National Institute of Animal Industry. Chibachi 280
- PEDERSEN, T.A.; OLSEN, R.A. & GULTORMSEN, D.M. 1973. **Acta Agriculture Scandinava**. 23:109
- VIERTAINEN, A.I. 1937. The Microbiology of ensilage production (Microbiologie de l'ensilage) Comptes rendus du Journées d'études de la conservation des fourrages. Association Française de Zootechnie. pp. 109
- WOOLFORD, M.K. 1972. **Herb. Abstr.** 42
- THE OXOID MANUAL. 1976. Third edition (revised). Published by Oxoid Limited. Wade Rood Basingstoke. Hampshire R. 624