

Influencia del residuo de piña sobre la presencia de lactobacilos homo y heterofermentativos en el ensilaje de pasto Cuba-CT115

Juan Avellaneda-Cevallos^{1,2}, Mayra Peña-Galeas³, Víctor Godoy-Espinoza¹,
Edwin Tapia-Moreno¹, Lola Casanova-Ferrín², Cinthia Zambrano-Calderón²,
Belky Alarcón-Solórzano³

¹Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

²Programa de Ganadería-EETP. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

³Universidad Técnica de Babahoyo. Extensión Quevedo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
javellaneda@uteq.edu.ec; juan.avellaneda@iniap.gob.ec

Resumen

Se realizó un experimento para evaluar el efecto del residuo de piña al ensilaje del pasto Cuba CT115, en los cambios de la presencia de bacterias ácido lácticas homo y heterofermentadoras. Se usó 36 microsilos productos de tres tratamientos (0, 5 y 10% de residuo de piña) con tres repeticiones, evaluadas en cuatro periodos de fermentación (14, 28, 42 y 56 días). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Para la comparación de medias de tratamientos se empleó la prueba de Tukey con una probabilidad de 5%. Se observó que la adición del residuo de piña al ensilaje de pasto CT115, incrementó la presencia ($p < 0.05$) de microorganismos homo y heterofermentadores, por lo que los resultados del experimento permiten concluir que es benéfico para el proceso de ensilaje de gramíneas, asociarlas con residuo de piña como fuente de carbohidratos solubles que potencialicen la fermentación anaeróbica y mejor conservación del forraje.

Palabras claves: Microbiología, fermentación, conservación de forraje, residuos.

Abstrac

This experiment was conducted to evaluate the effect of pineapple residue on silage grass Cuba CT115, on changes in the presence of hetero/homo fermentative lactic acid bacteria. 36 microsilos products of three treatments (0, 5 and 10% of pineapple residue) was used with three replications evaluated in four periods of fermentation (14, 28, 42 and 56 days). A completely randomized experimen-

tal design was used. For comparison of treatment means, the Tukey test was used with a probability of 5%. It was observed that the addition of residue pineapple on silage grass CT115, increased presence ($p < 0.05$) of hetero/homo fermentative microorganisms, so this experiment results support the conclusion that is beneficial to the process of grass silage, associate with pineapple residue as a source of soluble carbohydrates potentializing anaerobic fermentation and better preservation of forage.

Keywords: Microbiology, fermentation, forage conservation, waste.

Introducción

Los pastos tropicales tienen un alto potencial productivo, los cuales pueden alcanzar al año entre 100-150 toneladas de materia fresca por hectárea en sistemas intensivos; sin embargo, la producción en este tipo de forrajes manifiesta una estacionalidad marcada con abundancias en la época de lluvias y disminuida en la seca que se da en las áreas de pastoreo, lo cual afecta fundamentalmente los niveles de producción de la ganadería. Por ello, hay que utilizar un método de conservación como el ensilaje que permita entregar una fuente de alimento en la época más crítica de la producción ganadera (Enríquez *et al.*, 1999; Cardenas *et al.*, 2003; Rêgo *et al.*, 2010a)

Sin embargo, los pastos tropicales son susceptibles a pérdidas durante el proceso de ensilaje por su capacidad buffer, alta humedad ($> 70\%$) y bajo contenido de carbohidratos solubles, estas características perjudican la producción de ácido láctico, consecuentemente la reduc-

ción de pH en el ensilaje, el cual genera un ineficiente proceso fermentativo, por lo cual se hace necesario la búsqueda de un nivel de sustrato que en asocio con los forrajes permitan que este proceso de conservación se lleve de la mejor manera (Hassen *et al.*, 2009)

Ecuador cuenta con 5,000 hectáreas de cultivo de piña, ubicadas principalmente en las provincias de Los Ríos y Santo Domingo de Los Tsáchilas, permitiendo su disponibilidad todo el año. La mayor parte de fruta cultivada se destina a la exportación como fruta fresca, también se exporta elaborados de piña, entre los que están: deshidratada, jugo concentrado congelado y mermeladas. Empresas como Dole, Chiquita, Del Monte recurren a comprar la fruta a los pequeños productores para satisfacer la demanda ya que su capacidad de producción es menor a la capacidad de exportación. Sin embargo, los estándares de calidad exigidos por los mercados de destino provocan que parte

de la producción de piña sea rechazada, la cual puede ser aprovechada en la producción animal.

Con los antecedentes expuestos, la presente investigación tuvo como finalidad usar al proceso de ensilaje como un mecanismo de conservación de los excedentes forrajeros que se producen en los pastos tropicales, específicamente el pasto Cuba-CT115 (*Pennisetum purpureum*), además de identificar cuál es la mejor concentración de residuo agroindustrial de piña (*Ananas comosus*) que proporcione los carbohidratos solubles requeridos para un adecuado proceso de ensilabilidad, y con ello una mayor presencia de microorganismos homo y heterolácticos, lo cual permitirá a las ganaderías disponer de una tecnología que proporcione en la época de menos disponibilidad forrajera una fuente alimenticia que disminuya las variaciones productiva de los animales por falta de alimentos frescos y de calidad (Rêgo *et al.*, 2010b; Rodrigues *et al.*, 2007).

Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en la Sección de Microbiología del Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional, finca experimental “La María” ubicada en el km 7 vía Quevedo-El Empalme, en el cantón Mocache, provincia de Los Ríos, ubicada a 73 msnm, a 79° 29’

de longitud oeste, 01° 06’ de latitud sur. Las condiciones meteorológicas fueron las siguientes: Temperatura promedio de 25.18 °C, humedad relativa de 87.66%, heliofanía de 64.33 horas/luz/mes y una precipitación de 198.80 mm/mensual.

El material experimental estuvo compuesto por forraje de pasto Cuba-CT115 (*Pennisetum sp*) de 50 días, asociado al residuo de piña (0, 5 y 10%), ensilado en 36 microsilos como unidades experimentales, siendo este total de unidades experimentales el producto de tres tratamientos por tres repeticiones y por cuatro periodos de muestreo (14, 28, 42 y 56 días, apertura de silos). En este proceso las variables medibles fueron la presencia de bacterias homofermentadoras, bacterias heterofermentadoras, hongos y levaduras, y pH.

Se utilizó un Diseño experimental Completamente al Azar (DCA), y los resultados experimentales se analizaron empleando el procedimiento de los modelos lineales general (GLM por sus siglas en inglés), mediante el empleo del paquete estadístico SAS versión 9.0 y las diferencias de medidas fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($p < 0.05$) (SAS, 2004; Montgomery & Runger, 2009; Kaps & Lamberson, 2004).

La cosecha del pasto se la efectuó de forma manual a una altura de 25 cm desde el suelo, luego se procedió a cortarlo en fracciones que tengan una longitud que se encuentre entre 3 y 5 cm de longitud. El residuo de piña que se utilizó en la investigación se originó del material rechazado por las plantas de procesamiento y embalaje de las haciendas aledañas a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, material que no cumple con los estándares de exportación o consumo nacional. La fruta utilizada se la picó manualmente con la finalidad de reducir el tamaño de partícula hasta un diámetro de 0.5 cm. La intención fue reducir el tamaño de la partícula, y así se pueda mezclar y homogenizar con el material forrajero proveniente del pasto Cuba CT115.

Para la elaboración de los microsilos se utilizaron 36 dispositivos cilíndricos de PVC de 10 x 30 cm, los cuales almacenaron alrededor de 3 kg de forraje o de la mezcla de forraje más residuo de piña, dependiendo del tratamiento y sus repeticiones. En el momento de la inserción del forraje o mezcla a los dispositivos, se ejerció el máximo de presión de forma tal que se elimine la mayor cantidad de aire de su interior y con ellos se evitó el mal desarrollo del proceso de fermentación y por ende el adecuado crecimiento microbiano benéfico (*Lactobacillus*).

Para el conteo microbiano, se

tomó una submuestra 10 g (proveniente de los 120 g) de cada tratamiento y repetición que fue mezclado independientemente con 90 mL de solución de NaCl estéril al 0.9% (w/v). Seguidamente se procedió a ubicar 10 mL de esta solución (10-1) en un tubo de ensayo de 20x180 mm, desde la cual se inició a efectuar las diluciones respectivas en serie 10-2 a 10-7, en 9 tubos que contenían previamente 9 mL de la solución salina anteriormente descrita.

Para la determinación de pH, preparó una solución de fosfato de potasio (KH_2PO_4) al 3.4% y de esta solución utilizar 1.25 mL diluidos en 1 L de H_2O para homogenizar las muestras. Se mezcló 450 mL de la solución de KH_2PO_4 con 50 g (10:1) de muestra, en bolsas plásticas estériles provistas de filtro homogenizar durante 2 minutos (Stomacher 3500). El extracto de la solución homogenizada y filtrada se utilizó para determinar el pH con un medidor de pH estandarizado con soluciones amortiguadoras comerciales de pH 4 y 10 (Fischer Scientific).

Cada catorce días y antes de la apertura de los microsilos se procedió a la preparación de los medios de cultivos diferencial específicos para la determinación de la presencia de lactobacilos homo y heterofermentadores, hongos y levaduras. Para la determinación de la presencia de bacteria homo y heterofermentativas,

se preparó el medio diferencial selectivo homo-heterofermentativo (HHD) propuesto por McDonald *et al.* (1987) para cual se suspendió 41.5 gramos del medio en un litro de agua destilada. Luego de ello se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121° C y se depositó en cajas de Petri aproximadamente 15 mL del medio de cultivo, dejándolo solidificar, el que se almacenó a 2-8° C hasta la siembra (McDonald *et al.*, 1987). El número de colonias obtenido fue expresado como una transformación logarítmica y promediando todas las diluciones para cada muestra (McEniry *et al.*, 2006).

Resultados y discusión

Bacterias Homo y Heterofermentadoras

Cuadro 1. Presencia (log10 UFC/g ensilaje) de lactobacilos homofermentativos en el ensilaje de pasto Cuba-CT115 (*Pennisetum purpureum*) asociado con varias concentraciones de residuo de piña (*Ananas comosus*)

Formulación	Periodos de ensilaje (días)			
	14	28	42	56
CT115 + 0% piña	5.90b	6.06b	6.04c	6.03b
CT115 + 5% piña	6.05a	6.18a	6.18b	6.09ab
CT115 + 10% piña	6.11a	6.25a	6.26a	6.16a
EEM*	0.037	0.024	0.020	0.028

*EEM=Error estándar de la media. Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey $p < 0.05$)

La presencia de bacterias heterofermentativas, en el ensilaje de pasto Cuba CT115, presentó similar comportamiento estadístico que el evidenciado por las homofermentati-

vas, por efecto de la adición de residuo de piña (Cuadro 2). La adición del residuo en 5 y 10%, propició mayor presencia de bacterias heterofermentadoras al ser comparada con

Se observó que la presencia de lactobacilos homofermentativos expresados como log10 de UFC/g, se vieron estimulados por la adición de residuo de piña al ensilaje del pasto cuba CT115. A los 14 y 28 días del proceso, tanto la adición del 5 y 10% del residuo de piña, motivaron igual incremento ($p > 0.05$) en la presencia de los lactobacilos homofermentadores; sin embargo, a los 42 días la adición del 5%, superó al testigo (CT115 + 0% piña) y el suministro de 10% a los dos anteriores, evidenciándose un claro efecto de éste en el proceso fermentativo. A los 56 días, la diferencia estadística ($p < 0.05$) en concentración de microorganismos solo se pudo observar entre el tratamiento que no poseía residuo de piña y en el de 10% (Cuadro 1)

el testigo (CT115 + 0% piña). Este comportamiento se presentó en todos los periodos de fermentación, acepto en el de 56 días, en el cual, la presencia de los microorganismos fue similar entre el nivel de 0 y 5%, y el de 5 y 10% ($p>0.05$), sin embargo, existió supremacía ($p<0.05$) en el ensilaje con 10% de piña versus el testigo.

Según lo manifestado por McDonald *et al.* (1987) el número de bacterias ácido lácticas necesarias para un buen proceso de fermentación y conservación del ensilaje debe de estar en alrededor de $8.0 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de forraje ensilado, sin embargo muchos autores han reportado valores que van desde 3.7 a $6.3 \log \text{ UFC g}^{-1}$

(Filya *et al.*, 2006; Ventura *et al.*, 2004), valores similares a los encontrados en la presente investigación. Por su parte, cuando se analizó la presencia de microorganismo homo y heterofermentadores, se pudo observar que existió mayor presencia de homofermentadores, resultados que concuerdan con Bernardes *et al.* (2005) quienes manifiesta que en los dos primeros días del proceso de conservación la población de microorganismos cambia de una mayor concentración de heterofermentadores a homofermentadores, cuando se utiliza pelet de pulpa de cítricos como aditivo para mejorar del proceso de fermentación.

Cuadro 2. Presencia ($\log_{10} \text{ UFC/g}$ ensilaje) de lactobacilos heterofermentativos en el ensilaje de pasto Cuba-CT115 (*Pennisetum purpureum*) asociado con varias concentraciones de residuo de piña (*Ananas comosus*)

Formulación	Periodos de ensilaje (días)			
	14	28	42	56
CT115 + 0% piña	5.22b	5.24b	5.38b	5.46b
CT115 + 5% piña	5.48a	5.65a	5.69a	5.61ab
CT115 + 10% piña	5.58a	5.80a	5.73a	5.71a
EEM*	0.067	0.098	0.031	0.056

Hongos y Levaduras

En los silos de la presente investigación, no se evidenció la presencia de hongos y levaduras en ninguno de los tratamientos evaluados. La no presencia de hongos y levaduras, reportada en la presente

investigación se puede haber debido a las adecuadas condiciones de anaerobiosis, humedad y concentración de carbohidratos adecuados para que el pH descendiera a un nivel óptimo para la preservación de los tratamientos estudiados, fundamentándose esto por la posible mayor cantidad de ácido

lático producido en menor tiempo, lo que generó una caída pronunciada del pH favoreciendo la calidad del material ensilado en términos de no contaminación con microorganismos desfavorables como los hongos (Villa et al., 2010).

pH

El ensilaje de pasto CT115 al cual se le adicionó residuo de piña, presentó menor valores de pH, como producto de un buen proceso fermentativo. A los 14 días del proceso, los valores de pH más bajos los presentaron los tratamientos con 5 y 10% de residuo de piña, siendo estos dos estadísticamente iguales ($p < 0.05$), pero a los 28 días, el menor valor lo presentó en ensilaje con la mayor concentración de residuo de piña (10%), aunque, a los 42 días, no se evidenció cambios en el pH por efecto de los tratamientos (Cuadro 3).

Los resultados anteriores, son concluyentes que la adición de fuentes que mejoren los procesos de fermentación, propiciarán una disminución del pH, tal como lo manifiesta Muck (2010), quien en su revisión de datos de investigaciones realizadas con la adición de inoculantes, esta variable disminuyó en el ensilaje de maíz, desde 6.1 a 4.2, cuando este fue inoculado con *L. buchneri*, y en el caso de la investigación efectuada por Saarilalo et al. (2007), se encontró datos similares, disminuyendo el pH con la adición de inoculante constituidos por bacterias lácticas. Sin embargo, por su parte Rodrigues et al. (2007), no evidenciaron cambios en el pH cuando adicionaron pulpa de cítricos peletizada a los silos de pasto Elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum), asumiendo que, si bien es cierto que esta variable no fuera modificada estadísticamente, la composición química y valor nutricional del ensilaje se vio mejorada.

Cuadro 3. pH en el ensilaje de pasto Cuba-CT115 (*Pennisetum purpureum*) asociado con residuo de piña (*Ananas comosus*)

Formulación	Periodos de ensilaje (días)			
	14	28	42	56
CT115 + 0% piña	4.30a	4.21a	4.02a	4.00a
CT115 + 5% piña	4.02b	3.98b	3.99a	3.95ab
CT115 + 10% piña	3.90b	3.87c	3.89a	3.86b
EEM*	0.053	0.023	0.041	0.041

*EEM=Error estándar de la media. Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey $p < 0.05$)

Conclusiones

De acuerdo a los objetivos planteados se pudo concluir que la adición de residuo agroindustrial de piña (5 y 10%) al ensilaje de pasto Cuba CT115, mejoró la presencia de bacterias homo y heterofermentadoras en todos los periodos en estudio, concomitante a los más bajos valores de pH (menor a 4), lo que permite una adecuada conservación de las mezclas ensiladas.

Literatura citada

Bernardes, T., Reis, R., & Moreira, A. (2005). Fermentative and microbiological profile of marandu-grass ensiled with citrus pulp pellets. *Scientia Agricola*, 62(3), 214-220.

Cardenas, J., Sandoval, C., & Solorio, F. (2003). Composición química de ensilajes mixtos de gramíneas y especies arbóreas de Yucatán, México. *Técnicas Pecuarias México*, 41(3), 283-294.

Enríquez, J., Meléndez, F., & Bolaños, E. (1999). Tecnología para la producción y manejo de forrajes tropicales en México. Veracruz, Veracruz, México: INIFAP, CIRGOC.

Filya, I., Sucu, E., & Karabulut, A. (2006). The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. *Journal of*

Agradecimientos

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por el financiamiento, y a la Universidad Autónoma Chapingo y Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo de los Estados Unidos Mexicanos, por su participación como contraparte Internacional para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Applied Microbiology, 101, 1216-1223.

Hassen, A., van Niekerk, W., & Bechaz, F. (2009). Silage fermentation attributes and certain rumen parameters in sheep fed two grass silages harvested at different stages of maturity. *South African Journal Animal Science*, 39(Supplement 1), 229-233.

Kaps, M., & Lamberson, W. (2004). *Biostatistics for Animal Science*. Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE, London, UK: CAB International.

McDonald, L., McFeeters, R., Daeschel, M., & Fleming, H. (1987). A differential medium for the enumeration of Homofermentative and Heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 53, 1382-1384.

McEniry, J., O'Kiely, P., Clipson, N., Forristal, P., & Doyle, E. (2006). The microbiologi-

- cal and chemical composition of baled and precision-chop silage on a sample of farms in County Meath. *Irish Journal Agricultural Food Research*, 45, 73-83.
- Montgomery, D., & Runger, G. (2009). *Probabilidad y estadística aplicada a la ingeniería* (Segunda ed.). México, D. F., México: Limusa Wiley.
- Muck, R. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira Zootecnia*, 39, 183-191.
- Rêgo, M., Neiva, J., Cavalcante, M., Cândido, M., Clementino, R., & Restle, J. (2010b). Bromatological and fermentative characteristics of elephant grass silages with the addition of annatto by-product. *Revista Brasileira Zootecnia*, 39(9), 1905-1910.
- Rêgo, M., Neiva, J., Rêgo, J., Cândido, M., Carneiro, M., & Lôbo, R. (2010a). Chemical and bromatological characteristics of elephant grass silages containing a mango by-product. *Revista Brasileira Zootecnia*, 39(1), 81-87.
- Rodrigues, M., Lobo, J., da Silva, E., Borges, F., Meyer, P., & Demarchi, J. (2007). Efeito da inclusão de polpa cítrica peletizada na confecção de silagem de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum). *Revista Brasileira Zootecnia*, 36(6), 1751-60.
- Saarisalo, E., Skyttä, E., Haikra, A., Jalava, T., & Jaakkola, S. (2007). Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 327-336.
- SAS. (2004). *Institute. User's Guide: Statistics [CD-ROM Computer file]*. NC, USA: SASInst. Inc.
- Ventura, M., Canchaya, C., Zink, R., Fitzgerald, G., & van Sinderen, D. (2004). Characterization of the groEL and groES loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003. Genetic, transcriptional, and Phylogenetic analyses, 70, 6197-6209.
- Villa, A., Meléndez, A., Carulla, J., Pabón, M., Cárdenas, E. 2010. Estudio microbiológico y calidad nutricional del ensilaje de maíz en dos Ecorregión de Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 23(1):65-77.