

Artículo técnico

¿Cómo la respirometría puede indicar una reducción de la biomasa microbiana en ensilajes?

¿How can respirometry indicate a reduction in microbial biomass in silages?

Jackson Tapiero, Roberto Piñeros y Vilma A. Holguín

Grupo de Investigación Sistemas Agroforestales Pecuarios, Universidad del Tolima
vholguin@ut.edu.co

Resumen

Se realizó un ensayo para medir indicadores de calidad de los procesos de fermentación anaeróbica de los materiales orgánicos. Los indicadores monitoreados fueron: acidez (pH); la Temperatura; materia seca y la biomasa microbiana. Esta última se estima mediante análisis de actividad microbiana (respirometría); el recuento de UFC de bacterias, actinomicetos y hongos se realizó por el método de dilución en placa y medios de cultivo. Los análisis bromatológicos se realizaron en el laboratorio de ecofisiología de la Universidad del Tolima.

Palabras clave: bromatología; conservación de alimentos; actividad microbiana

Abstract.

A test was carried out to measure quality indicators of the anaerobic fermentation processes of organic materials. The monitored indicators were: acidity (pH); temperature; dry matter and microbial biomass. This last is estimated by microbial activity analysis (respirometry); the counting of CFU of bacteria, actinomycetes and fungi was carried out by the method of dilution in plates and culture media. The bromatological analyzes were carried out in the ecophysiology lab of the University of Tolima.

Keywords: bromatology; feed conservation; microbial activity

Introducción

Una de las preocupaciones para determinar la calidad del ensilaje, es saber en qué medida la reducción de la actividad microbiana se logra en el menor tiempo posible, para evitar la pérdida de nutrientes por proteólisis. Normalmente, los indicadores predilectos de esta tendencia son el pH y la temperatura, pues se espera que en la medida de lo posible la etapa aerobia sea muy rápida y por tanto esto se refleje en conseguir el pico de máxima temperatura en pocas horas y por tanto comience el descenso (Villalba, 2013).

El pH, se espera que en el menor tiempo posible descienda a valores entre 3,5 y 4,0 ojalá en las primeras 24 horas (Holguín et al.,2019).

No obstante, otros indicadores microbiológicos podrían constituir un referente de la cesación de la actividad microbiana, entre ellos, la respiración sugiere la masa de microbiota presente en los sustratos y su tendencia al decrecimiento a medida que transcurre el tiempo de ensilaje. Así, durante la fermentación del ensilado se pueden formar diferentes

productos gaseosos. El compuesto principal generalmente es el CO₂, que surge de la respiración de la planta utilizando O₂ residual en la masa de ensilaje (Pahlow et al., 2003)

La actividad microbiana medida en términos de la relación entre el CO₂ producido por respiración microbiana y el carbono de la biomasa microbiana CBM, denominado cociente metabólico (qCO₂) (Ferrerías, 2009.); esta, es una medida indicadora de modificaciones en procesos que suceden en los sustratos puesto que refleja la energía de mantenimiento de los microorganismos, la cual originalmente se ha utilizado en suelo, pero que sería válida para otro tipo de sustratos orgánicos.

La actividad microbiana, estimada por desprendimiento de dióxido de carbono constituye un importante indicador de la calidad del sustrato, el cual puede ser involucrado en un sistema de bioindicadores de fácil manejo (Mora-delgado et al., 2019).

Una intensa y diversa actividad microbiana puede ser el reflejo de óptimas condiciones físicas y químicas que permiten el desarrollo de los procesos metabólicos de bacterias, hongos, algas y actinomicetos y de su acción sobre los sustratos orgánicos (Alexander, 1994.); recíprocamente, una baja actividad y diversidad de la microbiota puede expresarse en un inadecuado funcionamiento químico y físico del sustrato analizado.

Los sustratos orgánicos considerados residuos de cosecha pueden ser una opción para la nutrición de los suelos como fertilizante o para la alimentación animal mediante la conservación mediante procesos de ensilaje. Este último camino, si sus nutrientes se conservan para ser suministrados en épocas de escasez. Así, en los sistemas agroforestales de finca cafetera es posible cuantificar gran cantidad de residuos, los cuales normalmente se desechan. El estudio de Piñeros et al (2011) permitió establecer que de los cultivos de café con sombra normalmente se produce un 46.0% de biomasa de residuos representados en

pulpa, cascarilla y mucilagos, además de los residuos del cultivo asociado más frecuente que son las musáceas en las cuales la biomasa residual puede llegar a un 90. Un análisis de la calidad bromatológica de esos residuos permite establecer su potencial como alimento ensilado, ya que los valores de proteína superan el 10% en la pulpa de café y los residuos de musáceas pueden contener alrededor del 5%. Así, estos nutrientes pueden ser reincorporados al sistema mediante el procesamiento como alimentos ensilados.

Como se dijo, la clave del ensilaje está en reducir al máximo la actividad microbiana en la etapa aeróbica. Varios métodos son usados para determinar esta actividad: la tasa de respiración (consumo de O₂ y emisión de CO₂), producción de ATP, biosíntesis de macromoléculas, producción y liberación de calor, transformaciones específicas como: amonificación, consumo de sustrato o acumulación de productos, actividad enzimática total y específica, tasa de mineralización de C, N, P y S, dinámica de la materia orgánica y del humus, densidad poblacional, biomasa, reacciones químicas específicas y observaciones microscópicas "in Situ" (Guerrero-Ortiz, 2012), siendo de las más usadas la actividad microbiana siguiendo la metodología de respirometría de Adani et al., (2004) y los protocolos de Vandevivere y Ramirez (1995), quienes desarrollaron una metodología para estimular el crecimiento de los microorganismos nativos de un sustrato mediante la adición de glucosa.

Este artículo técnico tiene como objetivo reportar los resultados del proceso de fermentación aeróbica en sustratos ensilados: pulpa del café y residuos de musáceas.

Materiales y métodos

Para la preparación de los ensilajes se empleó la técnica de bolsa para lo cual se requirieron los siguientes materiales:

- Bolsas de polipropileno para silo
- 5 Kg de melaza de azúcar
- 120 Kg de cereza de sustrato (café, hojas y falso tallo de plátano).
- Cinta transparente

- Cuerda de polipropileno.

En el laboratorio se emplearon los siguientes equipos

- Potenciómetro
- Termómetro
- Muflas
- Destilador de agua
- Balanza analítica
- Pipetas
- Buretas
- Elemeyer
- Frascos de vidrio
- Beakers.
- Vaso de precipitado
- Cinta de parafina

Procedimiento

La primera fase del proyecto se realizó en la granja experimental las Brisas, ubicada en el municipio de Ibagué, Tolima, a 1285 msnm, con una temperatura promedio de 24 ° C y una precipitación anual de 1706.9 mm.

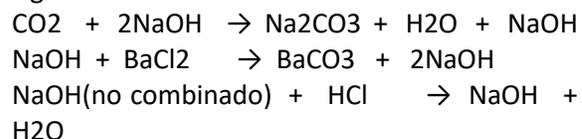
Allí se realizó el proceso de ensilaje que se llevó a cabo después de conseguir los subproductos orgánicos de la zona cafetera. Se procedió a realizar el picado de los sustratos para dejar un tamaño de partícula no mayor a cinco cm. Posteriormente, se llevo a cabo la mezcla y homogenización completa de los materiales a ensilar con melaza, en proporción 120Kg de sustrato de café y 5kg de melaza, hasta que quedara una mezcla homogénea.

La mezcla se procedió a depositarla en bolsas de polipropileno asegurando que dicho material quede bien aprisionado, llenando correctamente todos los espacios y tratando de extraer la mayor cantidad de aire de la bolsa. Finalmente, se sellaron las bolsas para impedir la entrada de aire.

En total se llenaron 24 bolsas cada una con 10kg de la mezcla y se dividieron en dos grupos con tres repeticiones cada uno. El tiempo de ensilado fue de 30 días. Cada semana se evaluó

temperatura, materia seca, y pH , además se estimo la actividad microbiana por respirometría siguiendo el protocolo de la respiración en jarras herméticas (Alef, 1995) Asi, la respirometría se hace con un recipiente de vidrio, dentro del cual se introduce un Beaker de 10 cc. En el beaker se llena 10ml de NaOH al 1N y se introducen en los frascos de mayor tamaño que contienen el ensilaje. Posteriormente se tapan los frascos y sellan con papel parafilm, para evitar pérdidas de CO2 liberado. Luego se incuban los frascos a temperatura ambiente. Pasadas 24 horas se realiza la titulación de la solución de NaOH de cada tratamiento, agregándole 2ml de BaCl2 y 1 gota de fenolftaleína, esta solución se titula con HCl al 1N y se registra el gasto de ml en cada tratamiento

Las reacciones químicas que se realiza son las siguientes:



Adición a las titulaciones de los diferentes ensilajes se realiza una titulación de un testigo (frasco sin ensilaje), que nos dara el valor de referencia para el cálculo del CO2 al cual se le restarán los mililitros gastados de NaOH en las otras muestras.

Calculos

ml HCl(testigo) - ml HCl= ml de NaOH(muestra problema transformada en Na2CO3)
 ml de NaOH(convertido en Na2CO2) x N(Normalidad) del HCl x 22= mg de CO2.

Los resultados se reportan en gramos del sustrato seco para lo cual se determina el porcentaje de humedad de cada muestra.

Finalmente, se valuó el comportamiento microbiológico de los ensilajes; para ello se realizó recuento de UFC de hongos, levaduras, Lactobacillus spp y presencia y ausencia de Listeria spp, Salmonella spp y coliformes, siguiendo los protocolo del laboratorio de

Diagnostico veterinario de la Universidad del Tolima.

Resultados y discusión.

En el cuadro 1 se pueden observar los resultados del análisis del producto final ensilado. Hay que resaltar en este análisis que materiales que normalmente se desechan en las fincas, el análisis químico demuestra la riqueza nutricional representado en la proteína, similar

a cualquier pasto tropical, principalmente en el ensilaje de pulpa de café y los residuos de musáceas; además, los niveles de materia seca, si bien son bajos, estos podrían mejorarse si se somete el sustrato a procesos de oreo para reducir el contenido de humedad.

El pH confirma que el proceso de ensilaje fue adecuado en los distintos sustratos.

Cuadro 1. Análisis químico de ensilajes de sustratos orgánicos de fincas cafeteras.

Ensilaje	Materia Seca (%)	FDN (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	pH
Residuos de plátano	8.4±0.8	50,7	5,3	15.2±0.1	39±0
Pulpa de Café	17.7±0.7	61,6	11,7	11.6±0	3.8±0

Actividad microbiana.

En la figura 1 se observa la cantidad de dióxido de carbono producido semanalmente por poblaciones microbiológicas en diferentes ensilajes en el transcurso de 4 semanas. Se aprecia que el ensilaje con mayor respiración y por ende mayor población microbológica fue el ensilaje a base de vástago de plátano y que el tratamiento que produjo mejor cantidad de dióxido de carbono fue el ensilaje a base de café.

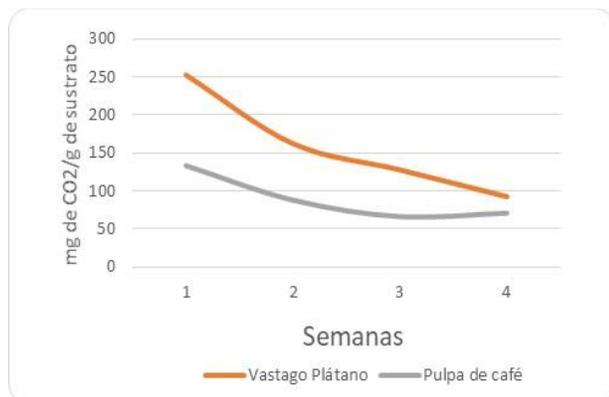


Figura 1. Actividad microbiana semanal acumulada en ensilajes de residuos orgánicos agrícolas de la zona cafetera: a) semestre II de 2010, b) semestre I de 2010.

Lo anterior sugiere que los subproductos de café presentan una menor actividad microbiana, posiblemente relacionada con la presencia de metabolitos secundarios que podrían inhibir esta actividad, aunque también puede sugerirse que la mayor actividad microbiana en el vástago de plátano ensilado corresponda a una mayor cantidad de carbohidratos solubles.

Hay una relación entre la actividad microbiana y el tiempo transcurrido de fermentación aeróbica, tendiente a la disminución. Tal tendencia se puede observar en los sustratos de pulpa de café y vástago de plátano (figuras 2 y 3). El ensilaje a base de residuos de musáceas presentó una tendencia lineal, encontrándose un factor de determinación ($R^2 = 0,6$) que sugiere que el 60% de la respiración puede explicarse con el tiempo de fermentación transcurrido. En contraste, la tendencia de la respiración con el sustrato de pulpa de café

sigue una tendencia polinómica, cuyo R^2 sugiere una mejor correlación entre la respiración y el tiempo transcurrido. Este modelo polinómico podría ser usado con alta nivel de correlación para predecir la producción de CO_2 por los microorganismos, y por tanto la biomasa microbiana (Mora Delgado et al., 2019), pues a medida que trascurren los días de ensilaje en su primera etapa aeróbica.

La producción de CO_2 tienden a bajar progresivamente ya que lo microorganismos no pueden consumir más energía, puesto que ya han utilizado la gran mayoría de carbohidratos solubles (. Alrededor de la segunda semana los microorganismos están trabajando con menor eficiencia pues ya han alcanzado su máxima producción las pérdidas de azúcares, producto de la hidrólisis del almidón (Villalba, 2013).

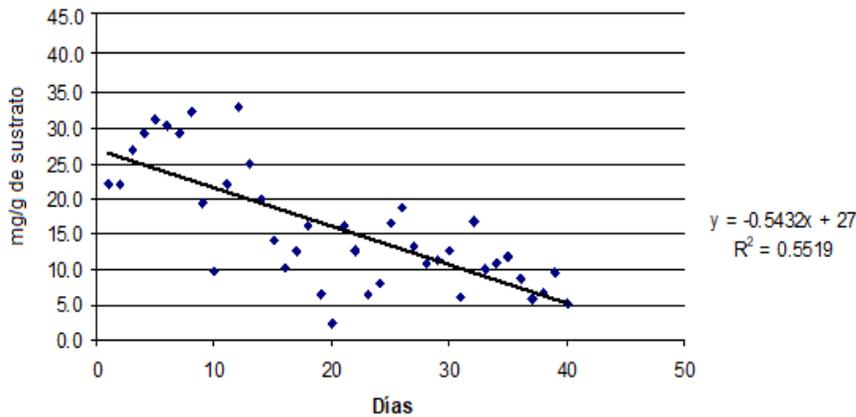


Figura 2. Actividad microbiana diaria en ensilaje a base de residuos de Plátano.

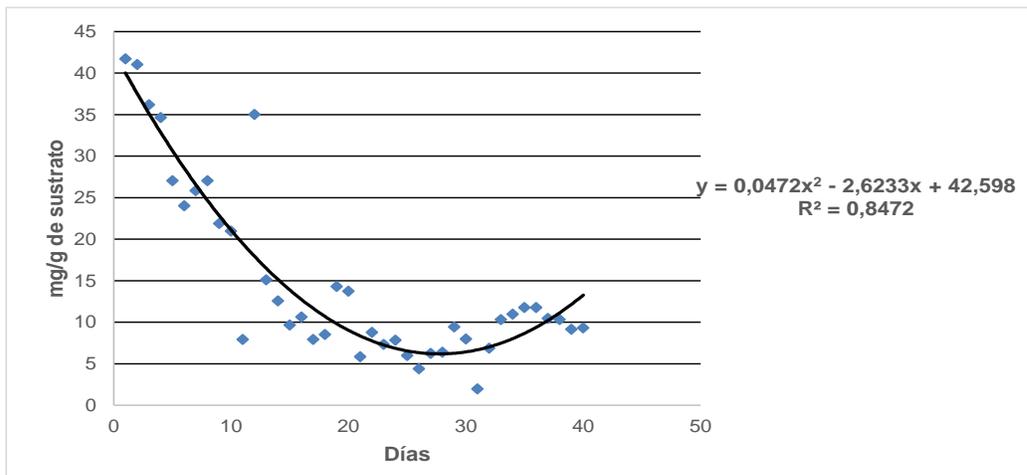


Figura 3. Actividad microbiana diaria en ensilaje a base de pulpa de café

A partir de la segunda fase de la fermentación se generan las condiciones favorables para el desarrollo microorganismos anaerobios que producen ácido acético y láctico que bajan el pH. Simultáneamente se inicia la eliminación de microorganismos patógenos intolerantes a

condiciones de pH ácidos que puedan perjudicar la composición del ensilaje (Holguín, 2016).

En las siguientes dos semanas o sea los dos últimas, se dan las condiciones favorables para obtener un alimento casi libre de patógenos que causen daños a la salud de los animales, puesto

que ya se ha eliminado todo el oxígeno que se encontraba dentro de la bolsa, dominan las bacterias ácido lácticas y el pH se estabiliza alrededor de 3.8 (Holguín et al., 2018; Buxton et al, 1996). A medida que pasan los días se presentan fluctuaciones de la actividad microbiana siguiendo una tendencia inversa, hasta llegar a niveles estables, en este caso entre 5 y 10 mg de CO₂/gr de sustrato de pulpa de café, momento en el cual el ensilaje está listo para ser suministrado a los animales (Figuras 2 y 3). El estudio de Li et al., (2017) indica que cuando el pH desciende a 4,6 en el ensilaje maíz y a 5,2 en el raigrás, la producción de CO₂ y los cambios adicionales en el pH se redujeron considerablemente. Esto refleja la supresión de la actividad microbiana y una mayor producción de ácido por la caída del pH.

En lo que respecta al conteo de microorganismos, los resultados preliminares muestran la presencia de los hongos *Geotrichum* sp. y *Penicillium* sp. con un total entre 28 a 111 UFC/g, donde los ensilados de pulpa de café mostraron los menores valores. En ninguno de los ensilados se detectó *Listeria* spp, *Salmonella* spp ni coliformes, sin embargo, se cuantificó la presencia de esporas *Clostridium* sulfito reductoras entre 10 y 400 UFC/g y el recuento de *Lactobacillus* spp se encuentra entre 10 y 150 UFC/g.

Conclusión

Se puede concluir que la actividad microbiana medida por espirometría constituye un indicador útil para estimar la presencia de microorganismos aeróbicos y la reducción de su actividad en la fase inicial del ensilaje. El proceso de ensilado utilizado en este estudio puede ser optimizado para aumentar el número de bacterias ácido lácticas (BAL) que eviten la aparición de hongos en el proceso del ensilado.

Referencias

Adani F., Confalonieri R. and Tambone F. (2004). Dynamic respiration index as a descriptor of the biological stability of organic wastes. *J Environ Qual.* Sep-Oct; 33(5), 1866-76.

Alef, K. (1995) Soil respiration. In: Alef, K & Nannipieri P. (eds). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. San Diego. 576pp

Alexander, M. 1977. *Introduction to soil microbiology*. (Second Edition. John Wiley & Sons. New York.

Buxton, D. R., Mertens, D. R., & Fisher, D. S. (1996). Forage quality and ruminant utilization. *Cool-Season Forage Grasses*, 1, 229-266.

Ferreras, L, Toresani, S, Bonel, B, Fernandez, E, Bacigaluppo, S, Faggioli, V & Beltran, C. (2009). Parametros quimicos y biologicos como indicadores de calidad del suelo en diferentes manejos. *Ciencia del suelo*. 27(1), 103-114.

Guerrero-Ortiz, P.L.; Quintero-Lizaola, R.; Espinoza-Hernandez, V.; Benedicto-Valdes, G.S.; Sanchez-Colin, M.J. (2012). Respiracion de CO₂ como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de *Lupinus*. *Terra Latinoamericana*, 30(4):355-362.

Holguín, V.A., Cuchillo-Hilario, M., Parra, M. and Martens, S. (2018). In-vitro assessment for ensilability of *Tithonia diversifolia* alone or with *Pennisetum purpureum* using epiphytic lactic acid bacteria strains as inocula. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 40. Doi: 10.4025/actascianimsci.v40i1.37940

Li, M., Shan, G., Zhou, H., Buescher, W., Maack, C., Jungbluth, K. H., Lipski, A., Grantz, D. A., Fan, Y., Ma, D., Wang, Z., Cheng, Q., & Sun, Y. (2017). CO₂ production, dissolution and pressure dynamics during silage production: multi-sensor-based insight into parameter interactions. *Scientific reports*, 7(1), 14721. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14187-1>

Mora Delgado, J y Silva Parra, A. (2019) Indicadores Microbiológicos De Calidad De Suelos Agroforestales. En: Mora Delgado, Jairo, Silva Parra, Amanda y Escobar Escobar Natalia Bioindicadores en suelos y abonos organicos . - 1ra Ed. Ibagué : Universidad del Tolima. 55-77

Mora Delgado, Jairo, Silva Parra, Amanda y Escobar Escobar Natalia (2019) Bioindicadores en suelos y abonos organicos. 1ra Ed. Ibagué: Universidad del Tolima. 55-77

Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude Elferink, S. J. W. H., & Spoelstra, S. F. (2003). Microbiology of ensiling. In DR. Buxton, RE. Muck, & JH. Harrison (Eds.), Silage Science and Technology (pp. 31-93). (Agronomy; No. 42).

Piñeros, R., Mora-Delgado, J. y Aya, S. (2011) Como estimar el flujo potencial de masas orgánicas en fincas campesinas de la eco-región cafetera. En: Mora Delgado, Jairo y Holguin Vilma Amparo (Eds.) Medios de vida y materiales orgánicos en fincas campesinas (Métodos de análisis en la ecorregión cafetera. Ibagué: Universidad del Tolima, Red Alma Mater, 150 Páginas.

Rooke, J. A., & Hatfield, R. D. (2013). *Biochemistry of Ensiling*. Lincon, NE: U.S. Department of Agriculture- Agricultural Research Service.

Vandevivere P., Ramirez C. (1995). Microorganismos y nutrimentos en abonos orgánicos: bioensayo microbiano para determinar los nutrimentos disponibles en abonos orgánicos. Boletín Tecnico de la Estacion Experimental Fabio Baudrit M. 28(2):90-96.

Villalba, D. (2013) Indicadores de Calidad de Ensilaje de Sorgo Dulce (*Sorghum saccharatum*) enriquecidos con aditivos de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus plantarum*. Tesis de M.Sc. Universidad del Tolima, Ibagué.