EFECTO DEL pH SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO*

R. Bodas, C.J. Newbold* y S. López
Dpto. Producción Animal I. Universidad de León. 24071 León
* Rowett Research Institute. Bucksburn, Aberdeen. AB21 9SB. Reino Unido.

INTRODUCCIÓN

En numerosos estudios se ha analizado y comprobado el efecto que el pH tiene sobre diversos parámetros de la fermentación ruminal, entre ellos la producción de metano y ácidos grasos volátiles y las proporciones molares de acetato y propionato (Lana *et al.*, 1998). Asimismo, al disminuir el pH se puede inhibir la lipolisis y biohidrogenación en el rumen, lo que explicaría el incremento en el grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en el rumen y de los que llegan al duodeno (Doreau y Ferlay, 1994; Demeyer y Doreau, 1999). El pH puede variar en función del tipo de dieta que ingiere el animal, pero también se puede intentar su modificación mediante el empleo de aditivos que actúen amortiguando las variaciones de pH que tienen lugar en el rumen, tales como el bicarbonato sódico.

El objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar los cambios provocados en la fermentación ruminal in vitro al incubar una ración para animales rumiantes modificando el pH del medio de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó como sustrato una ración, cuya composición (por kg) fue la siguiente: 500 g de heno, 300 g de cebada, 100 g de soja, 90 g de melazas y 10 g de corrector vitamínico mineral.

Las incubaciones in vitro se llevaron a cabo en viales de 125 ml, en cada uno de los cuales se pesaron aproximadamente 120 mg de la ración. El medio de cultivo empleado fue el descrito por Menke y Steingass (1988), modificando el pH mediante la adición de HCl concentrado hasta ajustar el pH a valores de 5,5, 6,0 y 6,5. Posteriormente el medio fue gaseado con CO_2 mientras se llevaba a ebullición.

Se recogió líquido ruminal de ovejas adultas fistuladas en el rumen y alimentadas con la misma ración que sirvió como sustrato en el experimento. El líquido fue recogido entre 1 y 2 horas después de la administración del alimento en la primera comida de la mañana y trasladado inmediatamente al laboratorio en un termo. En el laboratorio el líquido ruminal fue filtrado, mantenido a 39ºC con un burbujeo continuo de CO_2 y diluido con el medio de cultivo en una proporción de 1:2 (v/v). En condiciones de anaerobiosis se dosificaron 18 ml de líquido ruminal diluido en cada vial. Los viales fueron inmediatamente cerrados con un tapón de goma, precintados con una cápsula de aluminio y colocados en un baño de agua a 39ºC donde se incubaron con agitación continua.

Se realizaron tres tandas de incubación en días no consecutivos, utilizando en cada una de ellas líquido ruminal de un animal distinto para poder evaluar las variaciones entre individuos. Con cada inóculo se utilizaron cuatro viales para cada nivel de pH, para disponer de dos de ellos en cada muestreo.

El primer muestreo se realizó al inicio de la incubación tras la inoculación de los viales (0 h). Se abrieron los viales correspondientes, se midió el pH en el medio de incubación y se tomó una muestra para la determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y ácidos grasos de cadena larga (AGCL) mediante cromatografía de gases y de proteína mediante inmunoensayo. Los valores obtenidos fueron tomados como referencia para el cálculo de la producción de AGV, AGCL y del aumento de proteína en el cultivo tras 24 h de incubación. A las 24

horas se midió la cantidad total de gas producido, se detuvo la fermentación mediante la inmersión en un baño de hielo de los viales restantes y se tomó una muestra del gas acumulado en el espacio de cabeza del vial para analizar su composición mediante cromatografía de gases. Después de esto se abrieron los viales para proceder como en el caso anterior. Las muestras para la determinación de AGV, AGCL y proteína fueron mantenidas en el refrigerador hasta su análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tras 24 h de incubación se muestran en la Tabla 1. Se observó una diferencia significativa en la producción de acetato y propionato, cuya producción fue más de un 50% más elevada para los valores de pH de 6,0 y 6,5 con respecto a 5,5. La relación acetato/propionato disminuyó al aumentar el pH (3,85; 3,76 y 3,64 para valores de pH de 5,5; 6,0 y 6,5, respectivamente), al ser mayor el aumento relativo en la producción de propionato.

De igual manera, la cantidad total de hexosas fermentadas, calculadas según la fórmula propuesta por Demeyer y Van Nevel (1975), fue mayor ($P<0,05$) cuando el pH subió de 5,5 a 6,0 que cuando lo hizo de 6,0 a 6,5, siendo más de un 40% mayor para los valores de pH más altos (6,0 y 6,5) con respecto al más bajo (5,5). Al contrario que lo observado por Lana *et al.* (1998), no se encontraron diferencias significativas en la producción de metano, ni siquiera entre los valores más alto y más bajo de pH a pesar de que la diferencia numérica entre ambos niveles en la producción de metano fue de un 40%. El aumento en la cantidad de hexosas fermentadas al aumentar el pH, unido a la falta de diferencias significativas en la producción de metano, nos llevaría a sugerir que la mayor producción de metano observada por Lana *et al.* (1998) con valores más altos de pH ruminal se podrían deber no a un efecto directo de éste sobre las bacterias metanogénicas, sino más bien sobre la cantidad total de materia fermentada.

En cuanto a la producción de ácidos grasos de cadena larga, a pH 5,5 se observó una desaparición neta de ácido esteárico, que contrasta ($P<0,05$) con la producción neta de dicho ácido graso hallada para los valores de pH de 6,0 y 6,5. Por lo que respecta al C18:1, existe una diferencia numérica manifiesta cuando el pH varía de 5,5 a 6,0, que no alcanza el nivel de significación estadística debido a la alta variabilidad de las medias.

El descenso observado en la producción de esteárico para el pH más bajo, coincide con las observaciones realizadas por Demeyer y Doreau (1999), lo cual podría ser indicativo de una menor biohidrogenación, o bien de un descenso en la lipolisis. Al ser la segunda un prerrequisito para que suceda la primera, no quedaría elucidado si el efecto del pH sería sobre una, otra o ambas. Sin embargo, Kucuk *et al.* (2001) señalan que se ha descrito una baja biohidrogenación en animales comiendo dietas concentradas, coincidiendo con un menor pH.

Aunque no significativo, el acúmulo de C18:1 para el pH más bajo, coincidiendo con una desaparición neta de esteárico, podría ser indicativo de una falta de actividad de las bacterias de tipo B, responsables de la transformación de C18:1 en C18:0; lo cual sugeriría un mayor efecto del pH sobre las bacterias de tipo B que sobre aquellas clasificadas como de tipo A.

Los valores bajos de pH producen una inhibición de la fermentación ruminal, así como un descenso del metabolismo de los ácidos grasos presentes en la ración.

Tabla 1. Efecto del pH sobre la metanogénesis, producción de ácidos grasos volátiles y biohidrogenación de ácidos grasos.

	Valores de pH			
	5,5	6,0	6,5	EED
pH inicial	5,81	6,18	6,48	
pH final	5,25	5,51	6,96	
Producción en 24 horas (μmol)				
Acetato	239[a]	380[b]	397[b]	40,0*
Propionato	62[a]	101[b]	109[b]	11,1*
Butirato	83	90	83	4,6
Hexosas fermentadas (μmol/24 horas)[1]	233[a]	331[b]	336[b]	28,7*
Producción de metano (μmol/24 horas)	124	181	173	31,0
Recuperación de hidrógeno (%)[1]	92	97	89	11,1
Aparición de ácidos grasos (nmol/24 horas)				
C18:0	-180[a]	489[b]	699[b]	113,2**
C18:1	288	28	40	134,6
C18:2	-259	-451	-361	95,4
C18:3	-8	-6	-4	1,6

[1] Calculadas según las ecuaciones propuestas por Demeyer y Van Nevel (1975).
[ab] Medias con superíndices distintos en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05).
EED = Error estándar de la diferencia. * P<0,05; ** P<0,01.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEMEYER, D.I. & DOREAU, M. 1999. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. Proceedings of the Nutrition Society, **58**: 593-607.

DEMEYER, D.I. & VAN NEVEL, C.J. 1975. Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation, and its control. En: *Digestion and metabolism in the ruminant* (eds. McDonald, I.W. & Warner, A.C.I.) The University of New England Publishing Unit, U.S.A.

DOREAU, M. & FERLAY, A. 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. Animal Feed Science and Technology, **45**: 379-396.

KUCUK, O.; HESS, B.W.; LUDDEN, P.A. & RULE, D.C. 2001. Effect of forage:concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. Journal of Animal Science, **79**: 2233-2240.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. & VAN AMBURGH, M.E. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of Animal Science*, **76**: 2190-2196.

MENKE, K.H. & STEINGASS, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, **28**: 7-55.