

## CONTROL DEL PH *IN VITRO* PARA LA SIMULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN EN CONDICIONES DE ALIMENTACIÓN CONCENTRADA

Amanzougarene, Z., Schauf, S. y Fondevila, M.

IUCA, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. mfonde@unizar.es

### INTRODUCCIÓN

El pH del rumen juega un papel importante en los procesos de fermentación microbiana, afectando tanto selectivamente a los microorganismos implicados, como a la magnitud y evolución del proceso. El valor del pH ruminal es el resultado del balance entre producción y absorción de ácidos grasos volátiles, la secreción de tampones salivales y la actividad tampón propia de la dieta. En condiciones normales de alimentación con dietas forrajeras el pH ruminal se mantiene generalmente entre 6,0 y 7,0; sin embargo, desciende a valores entre 5,5 y 6,0 con niveles altos de concentrado.

Las técnicas *in vitro* basadas en sistemas cerrados con cultivos no renovados son muy útiles para predecir el valor nutritivo de los alimentos en los rumiantes, e incluso se han empleado para caracterizar la evolución de la fermentación ruminal. Sin embargo, los sistemas convencionales (Tilley y Terry, 1963; Theodorou et al., 1994) han sido diseñados para la valoración de sustratos fibrosos, manteniendo el pH del medio entre 6,5 y 7,0 mediante la inclusión en la solución de incubación de tampón bicarbonato, con una pequeña proporción de tampón fosfato (Goering y Van Soest, 1970). De este modo, aunque las condiciones de incubación simulan el ambiente ruminal en situaciones de alimentación con forrajes, están lejos de las promovidas por dietas concentradas. Dado que este tampón establece el equilibrio entre el ion bicarbonato aportado y el CO<sub>2</sub> de la atmósfera de la botella, el nivel de pH del medio dependerá de la concentración de bicarbonato en la solución de incubación (Kohn y Dunlap, 1998). Trabajos previos indican la importancia de considerar el pH del medio en los estudios de incubación *in vitro* como simulación de una alimentación rica en concentrados (Fondevila y Pérez-Espés, 2008; Bertipaglia et al., 2010).

El objetivo de este trabajo fue ajustar el pH del medio de incubación *in vitro* en función del nivel de inclusión de ion bicarbonato en la solución de incubación, y estudiar su efecto sobre la cinética de fermentación de un sustrato concentrado, con harina de cebada como modelo.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron dos tandas de incubación *in vitro*, a 39 °C y en atmósfera de CO<sub>2</sub>, siguiendo la técnica de Theodorou et al. (1994), omitiendo el uso de resazurina y microminerales. Se emplearon botellas de vidrio de 116 ml, en las que se incluyeron 500 mg de cebada (var. Graphic) molida a 1 mm y 80 ml de medio de incubación, preparado con 8 ml de inóculo y 72 ml de solución de incubación con 238 ml/l de solución tampón. Como inóculo se empleó líquido de rumen procedente de 3 ovejas canuladas en el rumen y alimentadas con 600 g de heno de alfalfa y 300 g de paja de cebada. El pH de la solución de incubación se ajustó a 6,50, 6,25, 6,00, 5,75 y 5,50, en función de la concentración de ion bicarbonato en la solución tampón (Kohn y Dunlap, 1998), tal como se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Concentración de sales de bicarbonato en la solución tampón para ajustar el pH de incubación y concentración final de ion bicarbonato en el medio de incubación.

pH	NaHCO <sub>3</sub> , g/l	(NH <sub>4</sub> ) HCO <sub>3</sub> , g/l	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mol/l
6,50	18,3	1,9	0,058
6,25	10,3	1,07	0,032
6,00	5,7	0,6	0,018
5,75	3,17	0,25	0,010
5,50	1,91	0,12	0,006

En cada tanda se incubaron, durante 12 horas, siete botellas por tratamiento experimental. Cada dos horas (a las 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h) se midió la producción de gas (manómetro HD2124, con sonda TP704; Delta Ohm, Caselle di Selvazzano, Italia), e inmediatamente se abrió una botella por tratamiento y se determinó el pH del medio (CRISON micropH 2001, Barcelona, España). La evolución de la producción de gas se estimó a partir de las dos

botellas mantenidas hasta las 12 h, transformando las lecturas de presión a volumen mediante una ecuación previa establecida en las mismas condiciones de incubación, y expresando el volumen por unidad de materia orgánica incubada. La media de ambas botellas se consideró como unidad experimental.

Las diferencias en el pH del medio y el efecto del pH inicial sobre la producción de gas a cada tiempo de muestreo se analizaron estadísticamente para cada tiempo de incubación, mediante ANOVA, considerando la tanda como bloque. No se consideró el efecto tiempo. En ambos casos, cuando la respuesta fue significativa, se estudió su evolución mediante polinomios ortogonales.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El pH del inóculo ruminal en las tandas de incubación 1 y 2 fue de 6,62 y 6,50, respectivamente. En todos los tiempos de muestreo se observó un descenso lineal ( $P < 0,001$ ) del pH del medio en función de la concentración decreciente de la capacidad tampón (Tabla 2). Además, tendió a descender de manera cuadrática a las 4 h ( $P = 0,081$ ), resultando esta evolución significativa a las 6 h ( $P = 0,006$ ), debido a que la modificación del pH a partir de la concentración de bicarbonato en el tampón permitió alcanzar el pH previsto ( $\pm 0,1$  unidades) a las 4, 6, 8 y 10 h de incubación en los tratamientos 6,25, 6,00, 5,75 y 5,50, respectivamente. A partir de dichos tiempos de incubación, el pH del medio se mantuvo en el rango previsto en los tratamientos 6,25 y 6,00, mientras que descendió ligeramente respecto al previsto en los tratamientos 5,75 y 5,50. Hay que tener en cuenta que la concentración de bicarbonato en los medios 5,75 y 5,50 fue un 17 y 10% respecto a la incorporada en el medio 6,5 (Tabla 1), y un 9 y 5% de la empleada en el tampón de Goering y Van Soest (1970). Por su parte, el pH del medio 6,50 se mantuvo desde el inicio de la incubación en el rango previsto, con modificaciones menores a una décima de pH hasta las 12 h de incubación, en que bajó ligeramente.

**Tabla 2.** Evolución del pH ruminal en función del pH estimado, basado en la concentración de ion bicarbonato en la solución de incubación.

pH estimado	Tiempo de incubación, h					
	2	4	6	8	10	12
<b>pH 6,50</b>	6,53	6,55	6,56	6,51	6,46	6,37
<b>pH 6,25</b>	6,37	6,35	6,31	6,29	6,25	6,28
<b>pH 6,00</b>	6,20	6,17	6,08	6,03	6,04	5,97
<b>pH 5,75</b>	6,06	5,99	5,90	5,83	5,72	5,51
<b>pH 5,50</b>	5,96	5,88	5,85	5,70	5,46	5,31
<b>EE</b>	0,034	0,021	0,022	0,035	0,042	0,095
<b>P lineal</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<b>P cuadrática</b>	NS	0,081	0,006	NS	NS	NS

EE: error estándar; NS:  $P > 0,10$

La producción de gas *in vitro* disminuyó de forma lineal ( $P < 0,05$ ) con el pH esperado del medio de incubación (Tabla 3), aunque dicho efecto mostró una tendencia cuadrática ( $P = 0,012$ ) a las 12 h de incubación, debido a que las diferencias entre el volumen de gas producido con el medio a pH 6,50, y en menor medida a pH 6,25, respecto al resto de tratamientos aumentaron a este tiempo de incubación respecto a muestreos anteriores. En este sentido, puede decirse que, a partir de las 8 h de incubación, los tratamientos que estabilizaron el pH de incubación 0,2 unidades por encima de 6,0 (pH 6,50 y 6,25) mantuvieron un aumento lineal en el tiempo del volumen de gas producido, mientras que el volumen de gas producido en la segunda mitad del periodo de incubación tendió a disminuir en los tratamientos que provocaron un pH del medio igual o inferior a 6,0. Es de destacar la correlación significativa entre la producción de gas a las 12 h y el pH del medio, no sólo al final de la incubación ( $R^2 = 0,629$ ;  $P = 0,004$ ), sino también cuando el pH se registró en tiempos anteriores, especialmente entre el volumen de gas a 12 h y el pH a las 6 h

( $R^2=0,836$ ;  $P<0,001$ ). El descenso en la producción de gas con el pH del medio se debe en parte a la menor actividad microbiana provocada por unas condiciones de fermentación menos favorables, o gas directo, así como por el descenso en la liberación de  $CO_2$  a partir del tampón al reducir la concentración de bicarbonato, o gas indirecto (Beuvink y Spoelstra, 1992), aunque a partir de los datos obtenidos en este trabajo no se puede discriminar la contribución de cada uno de ellos.

**Tabla 3.** Evolución del volumen de gas producido (ml/g materia orgánica) en función del pH estimado, basado en la concentración de ion bicarbonato en la solución de incubación.

pH estimado	Tiempo de incubación, h					
	2	4	6	8	10	12
pH 6,5	46,1	82,3	110,3	138,0	172,9	217,0
pH 6,25	44,6	80,0	107,1	130,6	156,5	184,5
pH 6,00	43,5	77,4	102,3	122,8	141,4	158,3
pH 5,75	41,2	71,9	95,9	117,3	136,3	152,3
pH 5,5	40,0	69,7	92,5	112,6	129,9	145,5
EE	1,39	2,12	2,48	3,13	4,16	4,45
P lineal	0,024	0,008	0,004	0,003	0,001	<0,001
P cuadrática	NS	NS	NS	NS	NS	0,013

EE: error estándar; NS:  $P>0,10$

De estos resultados se desprende que el pH deprime de forma lineal la fermentación del sustrato, por lo que para el estudio de sustratos en condiciones de alimentación concentrada es necesario ajustar el pH del medio a las condiciones estimadas de fermentación *in vitro*. Esto es factible modificando la concentración de bicarbonato en la solución de incubación. No obstante, la estabilidad de dicho ajuste disminuye con concentraciones de bicarbonato inferiores a 0,010 M, correspondientes a un pH estimado de 5,75.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bertipaglia, LMA, Fondevila, M, van Laar, H & Castrillo, C. 2010. Anim. Feed Sci. Technol. 159: 88-95
- Fondevila, M & Pérez-Espés, B. 2008. Anim. Feed Sci. Technol. 144: 196-211
- Goering, HK & Van Soest, PJ. 1970. Agriculture Handbook No. 379, ARS-USDA, Washington DC
- Kohn, RA & Dunlap, TF. 1998. J. Anim. Sci. 76: 1702-1709
- Beuvink, JMW & Spoelstra, SF. 1992. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:505-509
- Theodorou, MK, Williams, BA, Dhanoa, MS, McAlan, ADB & France, J. 1994. Anim. Feed Sci. Technol. 48: 185-197
- Tilley, JA & Terry, RA. 1963. J. Br. Grassl. Soc. 18: 104-111.

**Agradecimientos:** Financiado con el Proyecto AGL 2013-46820 (MINECO), con la ayuda del Departamento de Industria e Innovación (Gobierno de Aragón) y el Fondo Social Europeo. Z. Amanzougarene disfruta una beca del CIHEAM.

#### CONTROL OF PH IN VITRO FOR THE SIMULATION OF FERMENTATION IN HIGH CONCENTRATE FEEDING CONDITIONS

**ABSTRACT:** Five levels of pH (6.50; 6.25; 6.00; 5.75 and 5.50) were adjusted according to the inclusion of bicarbonate ion in the incubation solution, to simulate fermentation conditions under high concentrate feeding. The pH diminished linearly ( $P<0,001$ ) with the buffering of the media, and remained constant throughout the 12 h incubation period except for treatments 5,75 and 5,50, whose pH continued decreasing to 5,51 and 5,31 at 12 h, respectively. Gas production decreased linearly with the medium pH ( $P<0,001$ ) from 2 to 10h, and quadratically at 12 h. The total volume of gas produced after 12 h was correlated to pH at 12 ( $R^2=0,629$ ,  $P<0,01$ ) and 6 ( $R^2=0,836$ ,  $P<0,01$ ) h.

**Keywords:** buffering, pH, gas production, *in vitro*.