

ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO DEL FLUJO DE FASE LÍQUIDA Y DEL PH SOBRE LA FERMENTACIÓN MICROBIANA EN DIETAS CONCENTRADAS

Fondevila, M. y Pérez Estés, B.

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

INTRODUCCIÓN

La adecuación de las diversas alternativas *in vitro* propuestas para estimar la digestibilidad de los alimentos destinados a los rumiantes depende del grado de simulación de los parámetros fisiológicos que influyen en la fermentación microbiana de los alimentos, combinando la capacidad de control de éstos con la simplicidad del sistema. En este sentido, mientras los sistemas continuos (Hoover *et al.*, 1976) o semicontinuos (Czerkawski y Breckenridge 1977) son laboriosos y económicamente costosos, las alternativas más simplistas de valoración mediante desaparición del sustrato (Tilley y Terry 1963) o producción de gas (Menke y *et al.*, 1979; Theodorou *et al.*, 1994) obvian el control de aspectos importantes de la fermentación.

La limitación de estos sistemas sencillos se hace especialmente notable en su aplicación a la valoración de alimentos concentrados, para los que tanto el ritmo de tránsito de la fase líquida como el pH de incubación son determinantes de la magnitud de la actividad microbiana. El flujo de partículas solubles vehiculadas en la fase líquida puede afectar a la magnitud de la fermentación al reducir la disponibilidad de sustrato, pero por otra parte la renovación del medio puede favorecer la eficiencia de síntesis microbiana o inhibir mecanismos de retroinhibición enzimática. Por otra parte, el pH de incubación en estos sistemas se mantiene a niveles óptimos para la actividad microbiana (6,6- 6,9) mediante un tampón bicarbonato, pero estos valores están alejados del rango habitual en el rumen con dietas mixtas y concentradas. Además, la capacidad de este tampón para mantener un pH estable por debajo de 6,5 es limitada (Konh y Dunlap 1988), por lo que este parámetro cae rápidamente con concentrados como sustrato.

En este trabajo hemos aplicado un nuevo y simple sistema semicontinuo a la valoración del efecto del flujo de la fase líquida y de su ritmo de tránsito, así como del pH de incubación, sobre el grado y ritmo de fermentación de dietas mixtas con niveles altos de concentrado.

MATERIAL Y MÉTODOS

El sistema de incubación consta de un juego de botellas de unos 210 ml de capacidad total, provistas de dos bocas. Una de ellas se emplea para introducir el sustrato y, una vez sellada con un tapón de goma, para medir la presión interna como índice de la fermentación microbiana. La otra boca está provista de un filtro (150 μm de poro) controlado por una válvula externa, destinado al intercambio de la fase líquida. Para el funcionamiento del sistema, las botellas se llenaron con 140 ml de una mezcla de solución de incubación (Theodorou *et al.*, 1994) con un 20 % de líquido ruminal filtrado como inóculo. Se incubó 1,4 g de sustrato (mezcla 1:1 de heno de raygrás y grano de cebada, molidos a 1 mm) en cada botella, manteniéndose en baño de agitación a 38 °C durante 24 horas.

Se realizaron dos tandas de incubación con 12 botellas por tanda, en un diseño factorial 3 x 2 para el estudio del efecto de la renovación de la fase líquida (sin renovación, SR, y con flujos de 0,06 h⁻¹, FL y 0,10 h⁻¹, FR) y del pH de incubación (6,8 y 6,1), con dos repeticiones por tratamiento en cada tanda de incubación. El intercambio de fase líquida se estableció, en su caso, mediante la extracción de la parte proporcional de fase líquida cada 2 h durante las primeras 12 h, y cada 4 h de 12 a 24 h de incubación, y su sustitución por solución de incubación (sin inóculo ruminal). El pH del medio se fijó modificando la concentración de bicarbonato en la solución de incubación (0,111 y 0,029 moles de HCO₃⁻ para los pH 6,8 y 6,1, respectivamente). Inmediatamente antes del intercambio de fase líquida se registró la presión interna de las botellas, y se convirtió a volúmenes de gas mediante ecuaciones individuales para cada botella. Se determinó el pH del efluente a las 4, 8, 12 y 24 h, y se

muestreó el efluente a las 24 h de control para la determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), lactato y protozoos, y se determinó la desaparición de materia seca (dMS). Los resultados se analizaron estadísticamente por ANOVA, considerando la tanda de incubación como bloque. Se establecieron cuatro contrastes ortogonales para comparar los tratamientos: efecto del intercambio líquido a pH 6,8 (SR frente a FL y FR a pH 6,8); efecto del intercambio líquido a pH 6,1 (SR frente a FL y FR a pH 6,1); efecto pH (6,8 frente a 6,1); y efecto del ritmo de renovación de fase líquida (FL frente a FR). Las diferencias entre medias se compararon mediante el test de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de todo el periodo de incubación, el pH del medio en los tratamientos que implicaron renovación de fase líquida se mantuvo constante dentro del rango esperado (entre 6,6 y 6,8 y entre 6,3 y 6,1 para los tratamientos a pH 6,8 y 6,1). En estos casos, el pH medio a las 24 h fue de 6,67 y 6,08, respectivamente, mientras que cuando no se renovó la fase líquida descendió a 6,37 y 5,45 para los tratamientos a pH 6,8 y 6,1. El valor final de pH en el tratamiento SR a pH 6,8 quedó por encima del considerado limitante para la actividad microbiana, no así para el tratamiento a pH 6,1. La Figura 1 muestra que el volumen de gas de fermentación producido por unidad de materia orgánica incubada aumentó cuando se permitió la renovación de la fase líquida, tanto a pH 6,1 como a 6,8 ($p < 0,001$), indicando que la renovación de líquido puede favorecer una mayor síntesis microbiana o evitar mecanismos de retroinhibición enzimática, o ambos, compensando la salida del sistema de material soluble potencialmente fermentable. Sin embargo, entre 8 y 20 h de incubación el aumento del ritmo de renovación de 0,06 a 0,10 h^{-1} redujo la producción de gas ($p < 0,05$). El volumen de gas producido fue afectado por el pH de incubación desde las 2 h ($p < 0,05$), siendo mayor a pH 6,8 que a 6,1.

De acuerdo con los resultados de producción de gas, en la dMS (Tabla 1) se observó una respuesta positiva a la renovación de medio líquido, tanto a pH 6,8 como 6,1 ($p < 0,01$), pero el aumento del ritmo de intercambio tendió ($p < 0,10$) a aumentar la dMS, probablemente a partir de las partículas solubles en la fase líquida. La dMS fue menor ($p < 0,05$) a pH 6,1 que a pH 6,8. La concentración de protozoos en el efluente fue mayor a pH 6,8 ($p < 0,05$), pero no fue afectada por la renovación de fase líquida. Hay que hacer constar que en algunas botellas (3 a pH 6,1 y 1 a pH 6,8) no se observaron protozoos al final de la incubación. Tanto la concentración de lactato como la de AGV disminuyó al permitir el flujo de fase líquida a pH 6,8 ($p < 0,01$) y a pH 6,1 ($p < 0,05$), siendo este efecto mayor al aumentar la tasa de renovación ($p < 0,10$ y $p < 0,05$, respectivamente). El perfil de AGV no se modificó por la renovación de líquido a pH 6,8, pero sí a pH 6,1 ($p < 0,05$), reduciéndose la proporción de acetato en beneficio del propionato. Aunque el pH bajo redujo la concentración de AGV ($p < 0,01$), no afectó a la de lactato. La reducción del pH también disminuyó la proporción de acetato y aumentó las de propionato y butirato ($p < 0,001$).

Estos resultados demuestran que los sistemas convencionales de producción de gas tienden a sobreestimar la fermentación microbiana de dietas mixtas o concentradas al valorarlas a pH 6,8 en lugar de a pH más acordes con los observados con dichas dietas. Además, la renovación de la fase líquida del medio y, en menor medida, el ritmo de ésta, afectan a los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Czerkawski, J.W., Breckenridge, G., 1977. *Br. J. Nutr.* 38, 371-384.
Hoover, W.H., Crooker, B.A., Sniffen, C.J., 1976. *J. Anim. Sci.* 43, 528-534.
Kohn, R.A., Dunlap, T.F., 1998. *J. Anim. Sci.* 76: 1702-1709.
Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W., 1979. *J. Agric. Sci. Camb.* 193, 217-225.
Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAlan, A.D.B., France, J., 1994. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197.
Tilley, J.A., Terry, R.A., 1963. *J. Br. Grassl. Soc.* 18, 104-111.

Figura 1: Evolución de la producción de gas (ml/g materia orgánica, MO) durante el periodo de incubación, de acuerdo con el patrón de sustitución de fase líquida (sin intercambio, ● ○; 0.06 h⁻¹, ■ □; 0.10 h⁻¹, ▲ △) o con el pH del medio (6,8, símbolos negros; 6,1, símbolos blancos). Las barras superiores indican el error estándar de las medias.

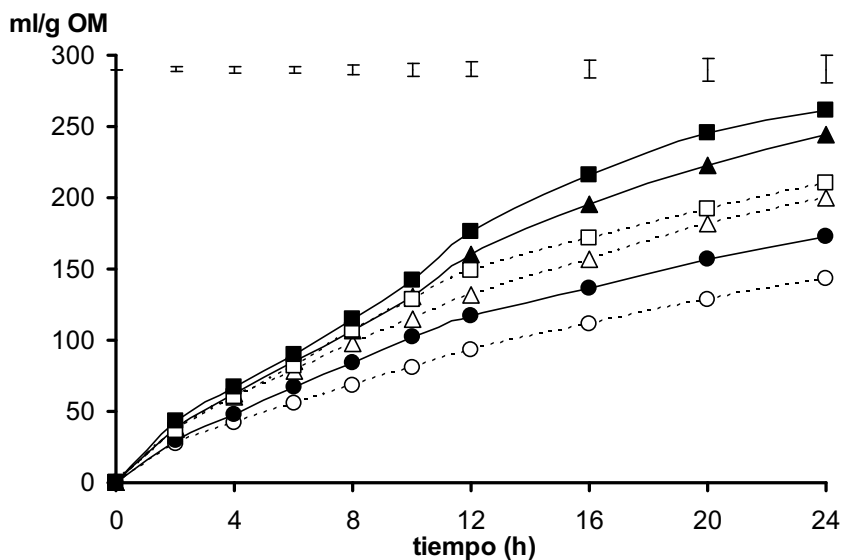


Tabla 1: Desaparición de materia seca (dMS), concentración de protozoos (log ml⁻¹) y concentración (mM) de lactato y ácidos grasos volátiles (AGV) junto con el perfil de AGV, a las 24 h de incubación. Se incluye la significación de los contrastes estadísticos.

	SI		RL		RR		e,e	contr.			
	6,8	6,1	6,8	6,2	6,8	6,2		1	2	3	4
dMS (%)	47,0	42,1	56,5	52,7	60,6	53,0	2,72	**	**	*	T
Protozoos	3,08	2,08	3,83	1,68	4,21	3,03	0,677	NS	NS	*	NS
Lactato	0,20	0,24	0,12	0,12	0,09	0,08	0,023	**	***	NS	NS
AGV	90,3	68,5	56,8	27,1	35,6	17,7	6,77	***	***	**	T
Acetato	66,1	60,3	66,7	55,7	71,1	55,2	1,57	NS	*	***	NS
Propionato	20,9	21,7	21,5	25,1	19,2	26,3	0,64	NS	***	***	NS
Butirato	10,8	15,6	10,6	17,7	9,2	17,7	1,03	NS	NS	***	NS

contrastes: 1, intercambio líquido a pH 6,8 (SI frente a RL y RR a pH 6,8); 2, intercambio líquido a pH 6,1 (SI frente a RL y RR a pH 6,1); 3, pH (6,8 frente a 6,1); 4, ritmo de renovación de fase líquida (RL frente a RR a ambos pH).

e.e.: error estándar; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; T: $p < 0,10$; NS: $p > 0,10$.