

## EFFECTO DEL pH EN EL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS FORRAJES<sup>1</sup>

Vargas<sup>1</sup>, J.E., López, S., Giráldez<sup>2</sup>, F.J., González, J. S.

Dpto. Producción Animal. Universidad de León. 24071 León. e-mail: s.lopez@unileon.es

<sup>1</sup> Departamento Sistemas de Producción, Universidad de Caldas, Colombia

<sup>2</sup> Estación Agrícola Experimental (CSIC), Finca Marzanas, 24346-Grulleros

Unidad Asociada al CSIC Grupo de Nutrición-Practicultura del Departamento de Producción Animal de la Universidad de León a través de la Estación Agrícola Experimental de León

### INTRODUCCIÓN

El pH de la digesta en el rumen es uno de los factores que influye de manera más significativa sobre la población microbiana y el patrón de fermentación ruminal (Lana *et al.*, 1998) y, consecuentemente, sobre la degradación de la pared celular vegetal. La producción de ácidos grasos de cadena corta tiende a reducir el pH, mientras que su absorción a través de las paredes del rumen y la secreción de saliva con una elevada capacidad amortiguadora son los principales mecanismos para neutralizar dicho efecto y mantener el pH dentro de un rango estrecho. El pH puede variar en función del tipo de dieta que ingiere el animal.

Con los métodos *in vitro* para el estudio de la fermentación ruminal es posible un control preciso de las condiciones de incubación. Sin embargo, el estudio del efecto del pH en condiciones *in vitro* (Grant y Mertens, 1992) plantea ciertas dificultades, ya que para poder mantener cultivos de microorganismos ruminales es preciso que en el medio de cultivo se incluya una disolución tampón que amortigüe las variaciones de pH (Menke y Steingass, 1988) provocadas por la acumulación de los ácidos grasos de cadena corta.

El objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar los efectos de la adición de diversos sustratos fermentables (cebada, heno) o distintas disoluciones amortiguadoras sobre el pH del medio de cultivo y sobre la digestibilidad *in vitro* de varios forrajes.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para las incubaciones se utilizó líquido ruminal obtenido de cuatro ovejas adultas provistas de cánula ruminal y alimentadas con heno de alfalfa. La recogida de muestras de digesta ruminal se realizó inmediatamente antes de la administración del alimento. El líquido ruminal fue filtrado y mezclado con el medio de cultivo en una proporción de 1:4 (v/v). El medio de cultivo empleado en el tratamiento control fue el descrito por Menke y Steingass (1988) que consiste en una mezcla de sales minerales en una disolución amortiguadora de bicarbonato (4 g (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> y 35 g NaHCO<sub>3</sub> por litro de agua destilada). Esta disolución se añadió al medio de cultivo de forma que en la mezcla final de líquido ruminal diluido su proporción fue de 190 mL/L. La preparación del medio de cultivo y la adición de líquido ruminal se realizaron en condiciones de anaerobiosis.

Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* se utilizó el procedimiento *in sacco* ANKOM. Las muestras se incubaron dentro de bolsitas confeccionadas con material sintético poroso (ANKOM F57). En cada bolsita se pesaron 250 mg de muestra. Las bolsitas se introdujeron en recipientes de vidrio de 4 L de capacidad (22 bolsitas en cada recipiente), añadiendo 2 L de líquido ruminal diluido. Los recipientes fueron introducidos en un incubador con agitación continua, manteniendo una temperatura constante de 39° C. Tras 24 h de incubación, las vasijas se introdujeron en un baño de hielo para interrumpir la fermentación. Posteriormente, se extrajo el líquido ruminal de cada recipiente, y las bolsitas fueron lavadas y aclaradas con agua destilada. A continuación, y utilizando el analizador de fibra de ANKOM, las bolsitas se sometieron a una extracción con detergente neutro a 100° C durante 1 h. Se realizaron varios aclarados con agua destilada y una final con acetona. Finalmente, las bolsitas se secaron en estufa a 65° C durante 48 h y, una vez pesadas, se determinó el residuo de incubación para calcular la digestibilidad *in vitro*.

<sup>1</sup> Proyecto de la Unión Europea REPLACE FP6-FOOD-CT-2004-506487

En todas las incubaciones se utilizaron cuatro alimentos comúnmente empleados en la alimentación de los rumiantes y que se caracterizan por poseer paredes celulares muy diversas tanto en su composición como en su estructura. Los cuatro forrajes utilizados fueron: heno de alfalfa (544 g FND/kg MS), heno de hierba (640 g FND/kg MS), paja de cebada (759 g FND/kg MS) y pulpa de remolacha (729 g FND/kg MS). En cada incubación, cada uno de los alimentos se incubó por quintuplicado.

**Ensayo 1:** En este ensayo las variaciones en el pH se provocaron añadiendo al medio de cultivo sustratos fermentables. La prueba se diseñó con tres tratamientos experimentales (un control y dos tratamientos), de forma que en cada tanda de incubación se utilizaron tres vasijas. La vasija control llevaba líquido ruminal diluido, mientras que en las otras vasijas se añadía directamente (no introducido en bolsitas) 1 g de harina de cebada o 1 g de heno de hierba finalmente molidos. En todos los casos se utilizó el medio de cultivo genérico descrito anteriormente, con la disolución amortiguadora de bicarbonato. La incubación se repitió en dos semanas distintas, de forma que para tratamiento se dispuso de 10 repeticiones (5 bolsitas en cada incubación x dos incubaciones).

**Ensayo 2:** En este ensayo las variaciones en el pH se provocaron sustituyendo la disolución amortiguadora del medio de cultivo por disoluciones de Mcllvaine con distintas proporciones de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y ácido cítrico. La prueba se diseñó con cinco tratamientos experimentales. La vasija control llevaba líquido ruminal diluido con la disolución amortiguadora de bicarbonato. En las otras vasijas, al preparar el medio de cultivo se sustituía dicha disolución amortiguadora por el mismo volumen de una de las siguientes disoluciones de Mcllvaine (MI): MI180, MI360, MI420 y MI480, que contenían 180, 360, 420 y 480 ml/L de ácido cítrico y 820, 640, 580 y 520 ml/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , respectivamente. En este caso se realizaron dos incubaciones, en la primera se incluyeron los tratamientos Control, MI180, y MI360, y en la segunda los tratamientos Control, MI180, MI420 y MI480.

Los resultados se analizaron mediante ANOVA con la tanda de incubación como factor de bloque y el tratamiento experimental como principal factor de variación. La comparación múltiple entre medias se realizó mediante el test de Bonferroni.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran los resultados del primer ensayo.

Tabla 1. Efecto de la adición de cebada o de heno al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad *in vitro* de varios forrajes.

	pH		Digestibilidad <i>in vitro</i>			
	Inicial	Final	Heno de alfalfa	Heno de hierba	Paja de cebada	Pulpa de remolacha
Control	6,97	7,00	0,496	0,446 a	0,378 a	0,709 a
Heno	7,00	6,70	0,495	0,436 a	0,371 a	0,706 a
Cebada	7,00	6,60	0,485	0,408 b	0,329 b	0,637 b
ESD			0,0120	0,0107	0,0113	0,0180
<i>P</i> =			0,491	0,002	<0,001	<0,001

<sup>ab</sup> Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

EED = Error estándar de la diferencia. *P* = nivel de significación estadística

La fermentación tanto de la cebada como del heno provocó un descenso apreciable del pH final en el medio de cultivo. A pesar de este descenso en el pH final del medio, no hubo diferencias entre tratamientos en la digestibilidad *in vitro* del heno de alfalfa. Por otra parte, al añadir cebada al medio de cultivo se observó una disminución significativa en la digestibilidad *in vitro* de los otros tres sustratos con respecto al control. Sin embargo, esta disminución no se observó cuando se añadió un sustrato fibroso (heno). Estos resultados parecen indicar que tanto el pH como el tipo de sustrato (almidón, carbohidratos estructurales) afectan a la población microbiana en el medio de cultivo, al patrón de fermentación y a la digestibilidad de los sustratos.

Los cambios del pH del medio provocados al utilizar distintas combinaciones del buffer citrato:fosfato de McIlvaine tuvieron un efecto significativo sobre la digestibilidad *in vitro* de los forrajes (Tabla 2). Con todas las disoluciones el pH se mantuvo relativamente constante (variaciones de una décima) durante las 24 h de incubación. En todos los casos, el descenso del pH provocó un descenso lineal de la digestibilidad *in vitro*, siendo este descenso más marcado en el caso de la paja de cebada y de la pulpa de remolacha.

Tabla 2. Efecto de la adición de distintas disoluciones amortiguadoras de McIlvaine al medio de cultivo sobre el pH y la digestibilidad *in vitro* de varios forrajes.

	pH		Digestibilidad <i>in vitro</i>			
	Inicial	Final	Heno de alfalfa	Heno de hierba	Paja de cebada	Pulpa de remolacha
Control	7,00	7,05	0,507 a	0,451 a	0,407 a	0,702 a
Buffer MI180	6,55	6,45	0,525 a	0,428 ab	0,286 b	0,545 b
Buffer MI360	6,30	6,40	0,520 a	0,402 b	0,284 b	0,468 c
Buffer MI420	5,90	6,00	0,451 b	0,314 c	0,152 c	0,407 d
Buffer MI480	5,80	5,90	0,450 b	0,320 c	0,142 c	0,406 d
EED			0,0180	0,0134	0,0190	0,0175
<i>P</i> =			0,013	<0,001	<0,001	<0,001

<sup>abcd</sup> Medias con superíndices distintos en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

EED = Error estándar de la diferencia. *P* = nivel de significación estadística

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GRANT, R.J. & MERTENS, D.R. 1992. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, **75**: 1581-1587.
- 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.