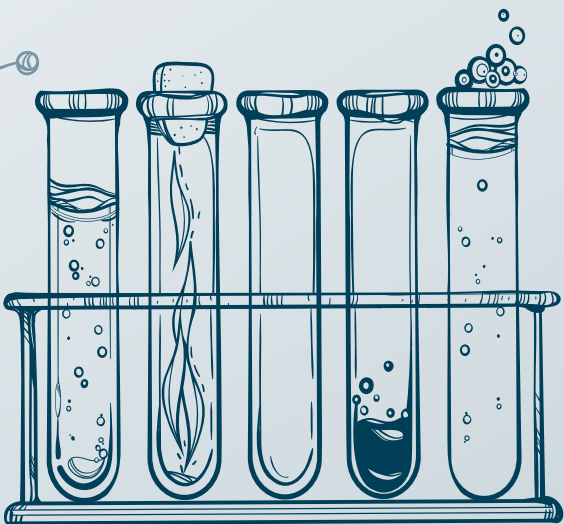


USO DE LA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS PARA LA VALORACIÓN NUTRITIVA EN RUMIANTES

María Dolores Carro Travieso

*Departamento de Producción Agraria,
ETSI Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas,
Universidad Politécnica de Madrid*



En los animales rumiantes **los alimentos son fermentados en el rumen antes de la digestión gástrica** y los productos finales de esta fermentación contribuyen en gran medida a cubrir sus necesidades energéticas y proteicas. Por ello, **la caracterización y cuantificación de estos productos es un punto clave para la valoración nutritiva de los alimentos.**

Si se desea **determinar la degradación ruminal y/o la síntesis de proteína microbiana** realizando una **valoración *in vivo***, se necesitan **animales fistulados en el rumen y en el abomaso o duodeno.**

El mantenimiento de animales fistulados no solo es costoso económica y laboralmente, sino que también plantea problemas éticos y presenta limitaciones legales. Estos inconvenientes han contribuido al **desarrollo de sistemas *in vitro*** que intentan simular la fermentación ruminal.

- La degradación de los alimentos en el rumen es un proceso complejo que implica interacciones entre los microorganismos ruminales (bacterias, protozoos, hongos y arqueas metanogénicas) y el animal hospedador, por lo que su simulación *in vitro* es complicada.
- Los principales factores que deben ser tenidos en cuenta en los sistemas *in vitro* son la temperatura, pH, capacidad tampón, anaerobiosis y el aporte de nitrógeno y nutrientes esenciales para los microorganismos ruminales.

TÉCNICAS *IN VITRO* PARA LA VALORACIÓN NUTRITIVA: Técnica de la producción de gas

Los sistemas *in vitro* más simples consisten en viales o botellas en los que se incuba la materia prima a valorar con líquido ruminal mezclado con una solución tampón en condiciones de anaerobiosis, a 39°C y un pH cercano a 7,0.

Este sistema es el utilizado para determinar la digestibilidad *in vitro* de los forrajes por el método de Tilley y Terry (1963).

Este método consiste en la incubación de la muestra en líquido ruminal tamponado durante 48 horas seguida de una incubación con pepsina en medio ácido, para simular de esta forma la degradación ruminal y la digestión gástrica, respectivamente.

Desde hace unos años ha adquirido un gran auge la **técnica de producción de gas (TPG)**, que consiste en una incubar una muestra en líquido ruminal tamponado y posteriormente medir la cantidad de gas producido en la fermentación a diferentes intervalos de tiempo.

Este sistema se basa en la que producción de gas está directamente relacionada con la cantidad de materia orgánica fermentada (*Menke et al., 1979*).



valoración nutritiva en rumiantes



¿Qué es lo que mide la técnica de producción de gas?

- Los microorganismos ruminales obtienen energía para su crecimiento a partir de la fermentación de los carbohidratos, fundamentalmente del almidón y los carbohidratos de la pared celular.
- Los carbohidratos se rompen y liberan monómeros (hexosas y pentosas) que son fermentados hasta ácidos grasos volátiles (AGV), CO₂ e hidrógeno (Figura 1).
- Las arqueas metanogénicas del rumen utilizan CO₂ e hidrógeno para formar CH₄, de tal forma que CO₂ y CH₄ son los principales gases producidos en el rumen.
- Los AGV se absorben y son utilizados por el animal hospedador para obtener energía y como precursores de la síntesis de otros compuestos, mientras que los gases son expulsados al exterior mediante el eructo.
- Los gases generados en la fermentación son los que se miden en la TPG, aunque también se genera gas a partir del tampón bicarbonato que se utiliza en el medio de cultivo usado en esta técnica.
- Como puede observarse en la Figura 1, la producción de acético y butírico genera CO₂ e hidrógeno, pero la producción de propiónico no solo no genera gas sino que consume hidrógeno.

La TPG únicamente mide la cantidad total de gas producido, por lo que no aporta información sobre el tipo de fermentación (perfil de AGV) que se produce.

Si se desea obtener esta información es necesario obtener una muestra del contenido líquido de los viales de incubación y analizar su concentración en AGV.

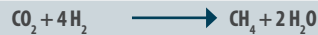
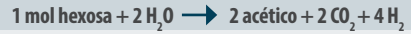


Figura 1. Reacciones estequiométricas de la fermentación ruminal de las hexosas (Hungate, 1966).

Metodología e interpretación de datos en la técnica de producción de gas

La TPG requiere una pequeña cantidad de muestra (generalmente molida a 1 mm), líquido ruminal y un medio de cultivo anaerobio que no limite el crecimiento de los microorganismos ruminales.

La metodología de esta técnica es relativamente sencilla (Figura 2).



Figura 2. Metodología utilizada en la técnica de producción de gas



PESAJE DE LA MUESTRA. La muestra se pesa en viales y a continuación se añade una cantidad determinada de la mezcla de líquido ruminal y medio de cultivo utilizando una bomba peristáltica para una dosificación precisa.

Las cantidades de muestra, líquido ruminal y medio de cultivo pueden variar entre laboratorios, pero una de las relaciones más utilizadas es 0,5 g de muestra, 10 ml de líquido ruminal y 40 ml de medio de cultivo.



TEMPERATURA DEL PROCESO. Un aspecto fundamental de todo este proceso es mantener una temperatura de 39°C y condiciones de anaerobiosis, ya que los microorganismos ruminales son muy sensibles al choque térmico y al oxígeno.



TIEMPO DE INCUBACIÓN. A continuación, los viales se cierran herméticamente y se colocan en un incubador a 39°C, donde permanecen durante al menos 72 horas para asegurar que se alcanza la degradabilidad potencial de la muestra.

La cantidad de gas producido se mide a diferentes intervalos de tiempo, que son menores al inicio de la incubación (2-3 horas) y se van ampliando a partir de las 12 horas de incubación (5-6 horas durante el primer día y posteriormente cada 12-24 horas).



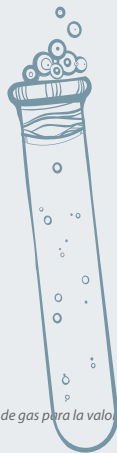
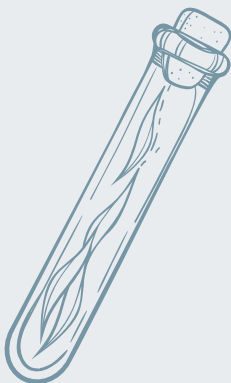
MEDIDA DE GAS PRODUCIDO. La medida de la producción de gas puede hacerse de forma manual (Figura 2) usando un manómetro y una jeringa calibrada (Theodorou et al., 1994), lo que permite obtener un valor de presión y volumen a cada tiempo de muestreo.

Con estos valores **se establece una ecuación de regresión que relaciona la presión y el volumen** según las condiciones del laboratorio (presión y temperatura) y **que permite estimar de forma precisa el volumen de gas** a partir de la presión medida con el manómetro.

Existen también sistemas automatizados en los que la presión se va registrando en un ordenador y el tapón de los viales lleva una electroválvula que se abre al alcanzar una presión determinada en su interior y permite liberar el gas producido. Estos sistemas requieren menos mano de obra y proporcionan un mayor número de medidas que los sistemas manuales, pero su precio es elevado.



FILTRACIÓN. Al finalizar la incubación, el contenido de los viales se filtra a través de crisoles con placa porosa para determinar gravimétricamente la cantidad de materia seca no degradada.





DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA

(MO). Posteriormente, se determina el contenido en materia orgánica del residuo filtrado para calcular la degradabilidad potencial de la materia orgánica de la muestra, ya que las cenizas no contribuyen a la producción de gas.



Un punto muy importante es **reproducir *in vitro* la variabilidad individual existente *in vivo*.**

Generalmente se incuban cuatro viales para cada muestra, que son llenados con el líquido ruminal de diferentes animales o se repite la incubación cuatro semanas seguidas utilizando una mezcla de líquido ruminal de varios animales para obtener cuatro réplicas por muestra.

➤ **Viales sin muestra (blancos) .**

Adicionalmente, es necesario incubar viales sin muestra (blancos) que solo contienen la mezcla de líquido ruminal y el medio de cultivo. Estos viales se utilizan para corregir los datos de producción de gas medida en los viales con muestra para la cantidad de gas generado en la fermentación del líquido ruminal usado como inóculo.

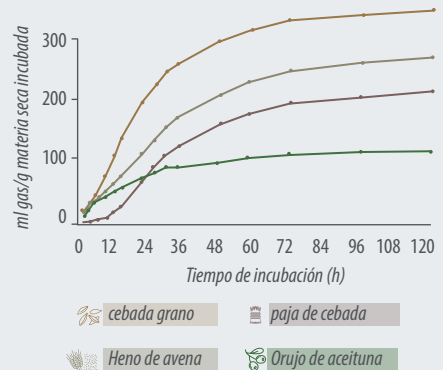
➤ **Origen de las muestras.** El líquido ruminal se suele obtener de animales canulados en el rumen, aunque también puede obtenerse en el matadero. Los laboratorios que usan esta técnica rutinariamente disponen de animales canulados, ya que las características del inóculo ruminal es uno de los principales factores que afectan a los resultados de la TPG.

Es fundamental que los animales donantes **reciban siempre la misma dieta y que la extracción de líquido ruminal se realice siempre a la misma hora**, generalmente antes de la administración de la primera comida del día. Además, es conveniente incubar un par de estándares para descartar la existencia de problemas en las incubaciones.



REGISTRO DEL VOLUMEN DE GAS.

El volumen de gas registrado a cada tiempo se suma al volumen producido anteriormente y así se construyen las curvas de producción de gas acumulada que se muestran en la Figura 3.



▲ **Figura 3.** Curvas de producción de gas acumulada de diferentes materias primas

Como se puede observar, las materias primas más degradables (**cebada grano**) no solo producen mayor cantidad de gas (ml/g de muestra) que las materias primas menos degradables (**paja** y **orujo de aceituna**), sino que también es mayor su ritmo de producción de gas, es decir los ml de gas producidos por unidad de tiempo.

• **Esta es una ventaja de la TPG frente a otras técnicas que miden la digestibilidad *in vitro*, ya que no solo se mide la extensión de la degradación, sino también su ritmo.**





MODELOS MATEMÁTICOS PARA REPRESENTAR LOS PERFILES DE PRODUCCIÓN DE GAS.

Los perfiles de producción de gas pueden ser descritos por diferentes modelos matemáticos. En la elección del modelo a utilizar debe tenerse en cuenta la bondad del ajuste estadístico a los datos experimentales, pero también el significado biológico de los parámetros que se obtienen.

Los modelos más utilizados son los **exponenciales**, que están basados en cinéticas de primer orden y asumen un ritmo fraccional constante de fermentación para todas las fracciones de la muestra.

Cuando se utilizan sistemas automáticos de medida de la producción de gas se suele realizar un mayor número de medidas y los datos pueden ajustarse a modelos multifásicos que permiten diferenciar las fracciones rápida y lentamente degradables de la muestra (*Williams, 2000*), pero su interpretación biológica es más complicada.

➤ Uno de los modelos más utilizados es el descrito por *Ørskov y McDonald (1979)*:

$$y = PP (1 - e^{-c(t-Lag)})$$

PP= producción potencial de gas

c = ritmo fraccional de producción de gas

Lag = tiempo necesario para que se comience a producir gas

t = tiempo de medida

➤ **Calculando el ritmo medio de producción de gas.** Con estos parámetros se puede calcular el ritmo medio de producción de gas, que es el **ritmo de producción de gas entre el inicio de la incubación y el tiempo al que se alcanza la mitad de la producción potencial de gas.**

- Este parámetro tiene un mayor significado biológico que el ritmo fraccional de producción de gas (*c*), ya que indica el ritmo de degradación de las muestras en el período inicial de su incubación.
- Este período suele ser similar al tiempo de retención de la digesta en el rumen, especialmente en materias primas con un contenido bajo-medio en fibra neutro detergente.
- Los valores del ritmo medio de producción de gas para las materias primas mostradas en la Figura 3 fueron 9,13, 5,31, 3,62 y 4,27 ml/h para la cebada, heno de avena, paja de cebada y orujo de aceituna, respectivamente, lo que indica que la cebada fue fermentada más rápidamente (entre 1,7 y 2,5 veces) que el resto de las materias primas analizadas.



- Los parámetros obtenidos en la modelización de los datos de producción de gas permiten también **estimar la degradabilidad efectiva de la materia orgánica (DEMO)** para un determinado tiempo de permanencia de la digesta en el rumen mediante la fórmula:

$$DEMO = \frac{[DMO_{\text{potencial}} \times c]}{(c + k_p) e^{(-c \cdot \text{Lag})}}$$

$DMO_{\text{potencial}}$ = degradabilidad potencial de la materia orgánica

k_p = ritmo de paso de la digesta a través del rumen.

Los valores de k_p que suelen utilizarse son 0,04, 0,06 y 0,08 y corresponden a animales con un nivel de ingestión bajo, medio y alto, respectivamente. Estos valores aportarían información sobre la degradabilidad ruminal de una materia prima cuando es administrada a animales en diferentes situaciones productivas.



Aplicaciones y limitaciones de la técnica de producción de gas

- ✓ La TPG permite clasificar diferentes materias primas según el ritmo y extensión de su degradación ruminal, obteniendo valores que están fundamentalmente relacionados con su aporte energético.
- ✓ La información sobre el ritmo de degradación de las materias primas permite combinarlas adecuadamente en las dietas para maximizar el crecimiento microbiano y sincronizar la liberación de energía y proteína.
- ✓ La TPG es también muy útil para valorar nuevas materias primas, especialmente si se incuban simultáneamente dos o tres materias primas de valor nutritivo conocido, ya que en ese caso puede hacerse un análisis comparativo.
- ✓ La TPG presenta numerosas ventajas, como su relativa sencillez, la pequeña cantidad de muestra necesaria, un coste relativamente bajo y la posibilidad de analizar simultáneamente numerosas muestras.
- ✗ Sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados de esta técnica solo aportan información sobre la degradación ruminal de la muestra y no se obtiene información sobre su digestión en el resto del tracto digestivo.
- ✗ Además, el gas producido es únicamente uno de los productos finales de la fermentación ruminal y la TPG no aporta información sobre la producción de AGV, la degradación de la proteína o el crecimiento microbiano. La combinación de esta técnica con incubaciones de corta duración (17-24 h) en las que se mide la producción de AGV permite obtener información sobre el perfil de la fermentación ruminal de las materias primas analizadas.