

Ing.

ANIBAL JARRIN
ANDRADE

Dra.

SUSANA AVILA
SALAZAR

INFLUENCIA DEL AMONÍACO EN LA DESTRUCCION DE LA MICROFLORA Y MICRO- FAUNA RUMINAL POR ALTERACION DEL pH

Cátedra de Nutrición Animal
Facultad de Ingeniería Agronómica y
Medicina Veterinaria.

tes, que en condiciones normales debe ser metabolizado y reabsorbido.

INTRODUCCION.

En la literatura mundial relacionada con los procesos digestivos de los rumiantes, se ha descrito ampliamente el comportamiento de la microflora y microfauna a base de su acción sobre diferentes substratos, sus productos de degradación, de síntesis y en general, la conducta de los microorganismos ante innumerables variantes.

En el complejo proceso ruminal de los bovinos, se conocen una serie de factores con capacidad reguladora de las condiciones intrínsecas del hábitat de la microflora y microfauna normal. Estos se encargan de mantener el pH, humedad, volúmenes gaseosos, temperaturas, etc., comprendidos entre los valores normales exigidos para el desarrollo de la flora y fauna.

Un punto muy poco analizado, especialmente en nuestro medio, es el estudio de las modificaciones progresivas de la flora ruminal hasta su completa destrucción por la lenta elevación del pH del líquido ruminal, como consecuencia de la liberación y acumulación de amoníaco, proveniente de diferentes fuentes,

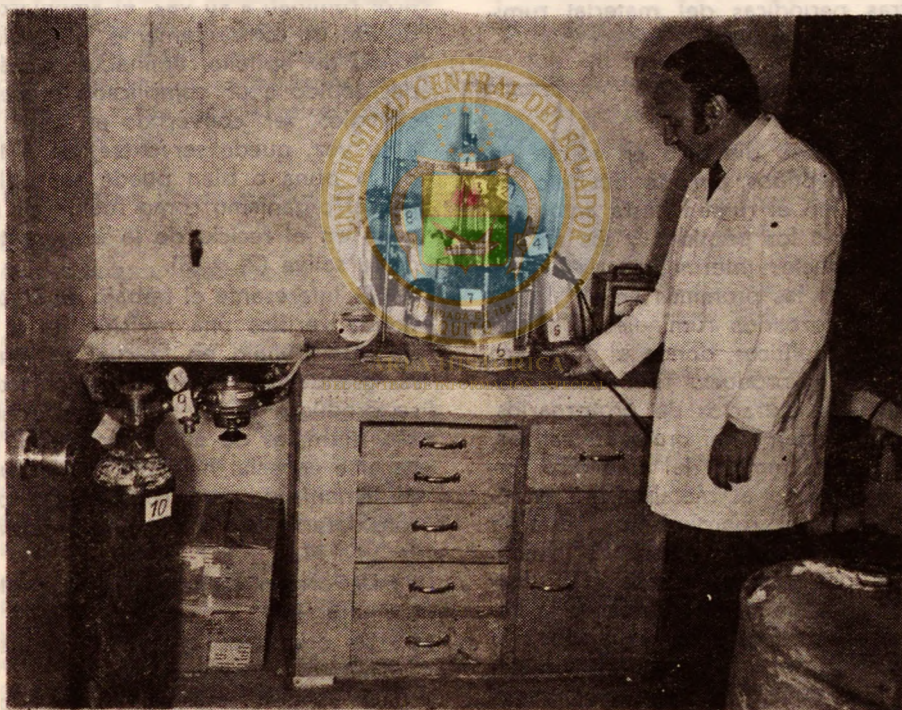
OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo fue demostrar la existencia de las alteraciones de la flora y fauna ruminal, como consecuencia de la modificación del pH, causado por la elevación del contenido en amoníaco, para cuyos fines se realizaron investigaciones en varias etapas sucesivas:

1.— La primera fase de la investigación consistió en reproducir lo más fielmente posible el mecanismo ruminal, utilizando las principales características de un rumen artificial de vidrio, con el propósito de implantar, también artificialmente, ciertas modificaciones para poder estudiar:

- a) Obtención de valores correspondientes a pH, concentración de amoníaco relacionados a las modificaciones de la flora "in vitro".
- b) Respuesta de la microflora y microfauna a los tratamientos aplicados "in vitro".

2.— La segunda etapa de la investigación se basó en la reproducción experimental del cuadro en un toro joven, mestizo Holstein-Friesian, al cual se le



El Ing. Anibal Jarrin Andrade, profesor de la asignatura de Nutrición Animal de la Escuela de Ingeniería Agronómica, observa el funcionamiento del rumen artificial de vidrio, que ha sido adaptado en el Laboratorio de su cátedra, para estudios de investigación "in-vitro" de los principales procesos bioquímicos, originados por la actividad microbiana.

Ing.
ANIBAL JARRIN
ANDRADE
Dra.
SUSANA AVILA
SALAZAR

INFLUENCIA DEL AMONIACO EN LA DESTRUCCION DE LA MICROFLORA Y MICRO- FAUNA RUMINAL POR ALTERACION DEL pH

practicó una fistula ruminal de plástico acrílico, y por donde se obtuvieron las muestras periódicas del material ruminal para su estudio.

FUENTES DE AMONIACO.

El nitrógeno dietético en forma de proteínas, péptidos, aminoácidos, etc., es degradado en el rumen hasta amoníaco (NH_3), siendo los péptidos y los aminoácidos productos intermedios de la degradación de las proteínas en el rumen.

Los protozoarios ruminales son elementos proteolíticos, donde el amoníaco parece ser el producto final del metabolismo. En extractos de protozoarios, donde se pueden aislar proteasas activas, se estima que mucho del amoníaco formado es debido al metabolismo endógeno de estos microorganismos. Esto ha sido demostrado en una serie de investigaciones por Abbou Akkada (1). Trabajando con animales rumiantes tratados con antibióticos a fin de producir la desfaunación de los protozoarios ruminales, se han encontrado valores en contenido de amoníaco en el líquido ruminal muy superiores en los animales faunados que en los desfaunados, lo cual confirma el poder proteolítico de los protozoarios.

Se puede, entonces, deducir que el amoníaco es un producto metabólico final que se encuentra presente en el ru-

men, considerándose normales concentraciones entre 60 mg. por 100 cc. de lico: ruminal; a su vez, el amoníaco producido es constantemente absorbido a través del epitelio ruminal, para más tarde, debido a un complicado proceso fisiológico, ser convertido en urea; ésta, a su vez, puede ser excretada a través de la orina o bien puede ser utilizada por el organismo como fuente de nitrógeno en el reciclo de la urea, a través de la saliva (2) y (3).

Es interesante el trabajo de D. Lewis, donde verifica una revisión de la tesis de Mac Donald en la cual se analizan las grandes cantidades de amoníaco que se producen en el rumen, en condiciones normales de alimentación (4). Debe hacerse especial hincapié en las fuentes de amoníaco, para cuyo efecto puede considerarse en orden de importancia:

- a) De origen dietético, como proteínas naturales.
- b) De origen no proteico, como suplementos nitrogenados.
- c) De origen endógeno, aportado por secreciones.

En cualquiera de estas formas, el amoníaco actúa alcalinizando el líquido ruminal, condición que es contrarrestada por los productos acidificantes de las fermentaciones producidas por una flora y fauna ruminal normal.

MATERIALES Y METODOS.

Se construyó un rumen artificial de vidrio, basado en los trabajos de Barnett y Reid (5) al cual se aplicaron modificaciones según las necesidades de la investigación. Las características del rumen artificial son:

1. — Paredes impermeables a:

- a) Gases;
- b) Acidos grasos volátiles; y,
- c) Agua.

Esta condición de impermeabilidad trae como consecuencia que todos los gases: anhídrido carbónico, metano e hidrógeno (CO_2 , CH_4 y H_2), producidos por las fermentaciones microbianas, así como los ácidos grasos volátiles, producidos por la degradación de los principios inmediatos, como acético, propiónico, etc., que normalmente son absorbidos en el epitelio ruminal, sean retenidos en el líquido ruminal, pero como el aparato presenta una salida de gases (Nº 6 de la fotografía), estos productos son expulsados constantemente, de modo que no se produce alteración en el medio por su acumulación.

Con respecto a los volúmenes de agua que no son absorbidos, por las reducidas cantidades del elemento que son adicionales a través de la solución de saliva artificial, no influyen en el cultivo

a la vez que favorecen la proliferación bacteriana.

2. — Ambiente Anaerobio.

El sistema del rumen artificial presenta una entrada de gases (Nº 5 de la fotografía), que está conectada a un cilindro de CO_2 , el cual suministra un flujo de gas constante, regulado por un manómetro (Nos. 7 y 8 de la fotografía) intercalado al sistema, que mantiene un burbujeo controlado en 30 burbujas por minuto. Como el tubo suministrador de gas está colocado de tal forma que la salida de CO_2 es en el fondo del rumen artificial; de esta manera el burbujeo actúa como homogeneizador del cultivo al remover el líquido. Este ambiente de CO_2 permite mantener un medio anaerobio imprescindible para el desarrollo de la flora y fauna.

3. — Ambiente Termorregulado.

El rumen de vidrio se mantiene sumergido en un baño de María termorregulado, a una temperatura de 39°C ., lo que constituye una réplica de la temperatura interna del rumen "in vivo".

4. — Substrato.

Como dieta substrato para la flora y fauna en incubación se preparó una ración balanceada, la cual se almacena en

el depósito correspondiente (Nº 2 de la fotografía), administrándose al cultivo disuelta en proporción de 25 g. en 100 cc. de solución de saliva artificial como dosis inicial, luego en proporción de 20 g. disuelta en 100 cc. saliva artificial cada 24 horas mientras dure la investigación. Estas proporciones de alimento fueron calculadas a base de los volúmenes de material incubado. La composición del sustrato es:

	Porcentaje
Proteína cruda	16.0%
Fibra cruda	25.0%
Extracto etéreo	4.2%
Extractos no nitrogenados	49.8%
Cenizas	5.0%

La fórmula elaborada para la ración sustrato está compuesta por la siguiente materia prima:

	Gramos
Afrecho de trigo	14
Harina de palma real	6
Harina de pescado	19

Harina de algodón	10
Maíz finamente triturado	39
Alfarina	22

Total..... 100

El análisis proximal de esta ración sustrato, ha sido realizado en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ingeniería Agronómica y Medicina Veterinaria de la Universidad Central del Ecuador, por lo que se conoce exactamente las cantidades de nitrógeno que han sido utilizadas. Las características del sustrato son:

- a) Pulverizado;
- b) Ración balanceada;
- c) Deshidratado; y,
- d) Disuelto en solución de saliva artificial.

5.— Saliva Artificial.

Para la presente investigación se empleó la saliva artificial de McDougall, cuya composición es la siguiente:

	Gramos
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	9.80
Cloruro de potasio (KCL)	0.57
Cloruro de calcio. (CaCl_2)	0.04
Fosfato disódico. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9.30
Cloruro de sodio (NaCl)	0.47
Sulfato de magnesio. ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.12

Esta solución de saliva artificial actúa como "buffer", en el rumen artificial de vidrio.

RUMEN ARTIFICIAL DE VIDRIO

- 1.—Balón de 3 bocas de 2.000 cc. de capacidad, donde se cultiva el material ruminal.
- 2.—Embudo de decantación de 250 cc. para el suministro del sustrato.
- 3.—Embudo de decantación de 250 cc. para la solución de amoníaco.
- 4.—Embudo de decantación de 125 cc. para la toma de muestras.
- 5.—Entrada de CO_2 .
- 6.—Salida de gases.
- 7.—Cilindro de CO_2 .
- 8.—Manómetro.
- 9.—Baño de María termorregulado.
- 10.—Perilla de caucho para la succión de muestras.

6.— Curva de Calibración del Contenido de Amoníaco.

Para las mediciones del contenido amoniacal del líquido ruminal, se utilizó un espectrofotómetro "Baush-Lomb", a una longitud de onda de 550 μm .

A fin de trazar la curva de calibración, sobre la cual se determinaron las concentraciones de NH_3 de las muestras del líquido ruminal, se prepararon varias soluciones de concentración de NH_3 , según el siguiente procedimiento; que a partir de una solución madre 0.1 N de NH_3 se prepararon las diluciones que se indican a continuación: a) Tomar 4 cc. de la solución 0.1 N y llevar a 1.000 cc. con agua destilada; esta preparación contiene 6.8 mg. por litro de NH_3 ; b) Tomar 3 cc. de la solución 0.1 N y llevar a 1.000 cc. con agua destilada; esta preparación contiene 4.1 mg. por litro; c) Tomar 2 cc. de la solución 0.1 N. y llevar a 1.000 cc. con agua destilada; esta preparación contiene 3.4 mg. por litro de NH_3 ; d) Tomar 1 cc. de la solución 0.1 N. y llevar a 1.000 cc. con agua destilada; esta preparación contiene 1.7 mg. por litro de NH_3 ; e) Tomar 0.5 cc. de la solución 0.1 N. y llevar a 1.000 cc. con agua destilada; esta preparación contiene 0.85 mg. por litro de NH_3 .

De cada una de estas soluciones se toma 100 cc. y se añade 2 cc. del reactivo Nessler (específico para las determinaciones de NH_3). Como solución testigo (blanco) se empleó 100 cc. de agua destilada y 2 cc. del reactivo Nessler.

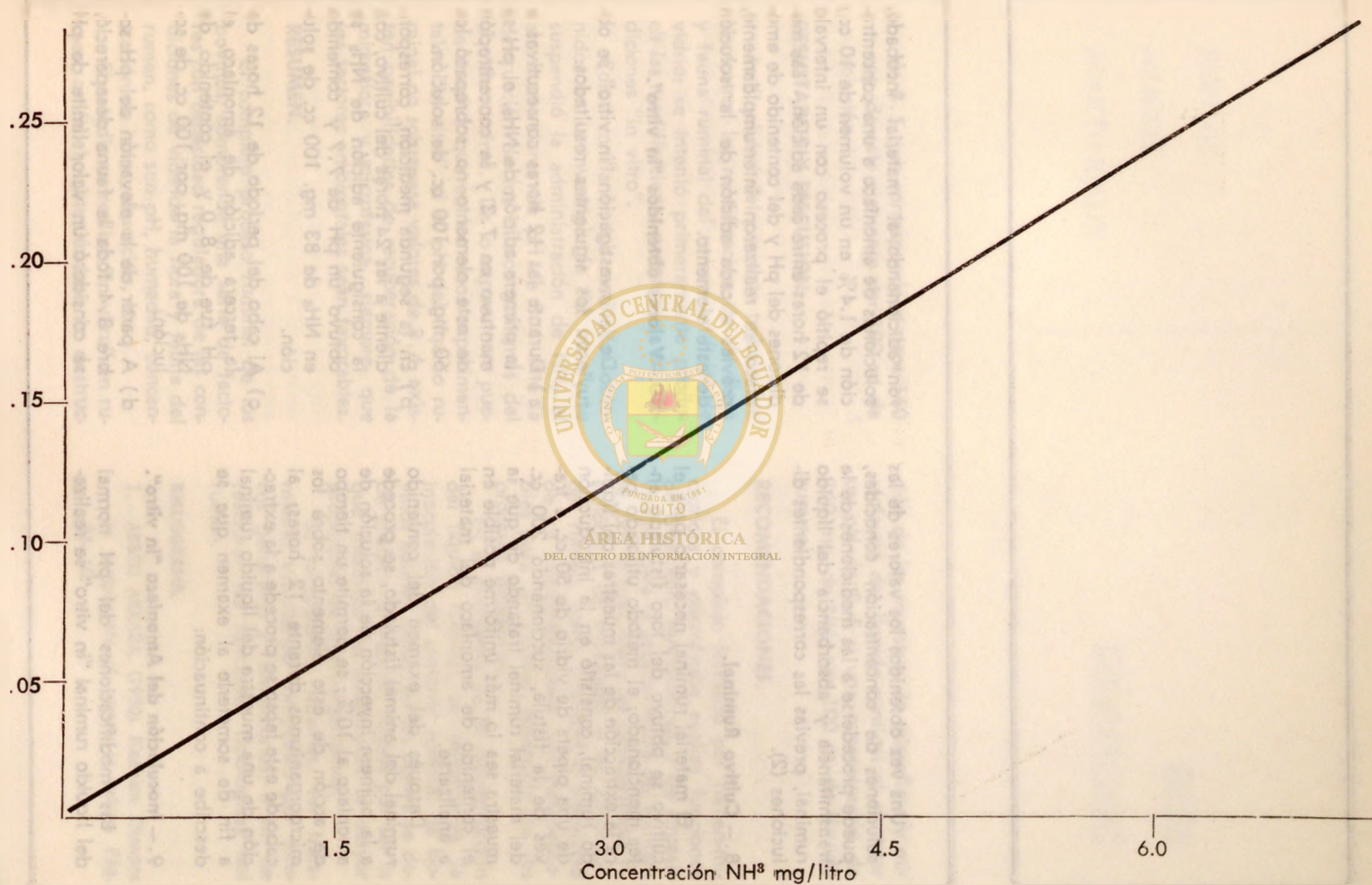
7.— Lecturas fotolorimétricas de las soluciones preparadas.

Solución	Concentración NH ₃ mg/litro.	% de Transmitancia	% de Absorbancia
1	6.8	58	0.237
2	5.1	66	0.181
3	3.4	72	0.143
4	1.7	79	0.102
5	0.9	87	0.061



ÁREA HISTÓRICA
DEL CENTRO DE INFORMACIÓN INTEGRAL

D.O.



Una vez obtenidos los valores de las soluciones de concentración conocidas, puede procederse a las mediciones de la transmitancia y absorbancia del líquido ruminal, previas las correspondientes diluciones (2).

8.— Cultivo Ruminal.

El material ruminal necesario para el cultivo se obtuvo del toro fistulado antes mencionado; el método utilizado para la extracción de las muestras del líquido ruminal, consistió en la introducción de una pipeta de vidrio de 50 cc. a través de la fístula, succionando 200 cc. del material ruminal tratando de que la muestra sea lo más uniforme posible en el contenido de amoníaco del material a analizarse.

Después del examen del contenido ruminal del animal fistulado, se procede a la primera inyección de la solución de amoníaco al 10%; se permite un tiempo de acción de este elemento sobre los microorganismos durante 12 horas; al cabo de este lapso se procede a la extracción de una muestra del líquido ruminal a fin de someterle al examen que se describe a continuación:

9.— Inoculación del Amoníaco "in vitro".

Las modificaciones del pH normal del líquido ruminal "in vitro" se realiza-

ron adicionando al material incubado, soluciones de amoníaco a una concentración de 1.4% en un volumen de 10 cc.; se repitió el proceso con un intervalo de 12 horas entre cada adición. Las mediciones del pH y del contenido de amoníaco se realizaron interrumpidamente, previas a cada adición de la solución de este elemento.

10.— Valores obtenidos "in vitro".

De la investigación "in vitro" se obtuvieron los siguientes resultados:

- a.) Durante las 12 horas consecutivas a la primera adición de NH_3 , el pH se mantuvo en 7.3 y la concentración de este elemento no sobrepasó los 60 mg. por 100 cc. de solución.
- b.) En la segunda medición, correspondiente a las 24 horas del cultivo, con la consiguiente adición de NH_3 se obtuvo un pH de 7.7 y contenido en NH_3 de 83 mg. 100 cc. de solución.
- c.) Al cabo del período de 12 horas de la tercera adición de amoníaco, el pH fue de 8.0 y el contenido de NH_3 de 100 mg. por 100 cc. de solución.
- d.) A partir de la elevación del pH sobre 8.4 toda la fauna desapareció, se consideró un valor límite de pH

RONNIE

MUÑOZ

MARTINEAUX

de 8.5 que corresponde a unos 160 mg. de este elemento por 100 cc. de solución.

RESULTADOS Y DISCUSION.

La finalidad del presente trabajo fue demostrar la modificación de la flora y fauna ruminal del rumen artificial de vidrio; se intentó primeramente producir las modificaciones progresivas en condiciones "in vitro".

Como consta en los resultados obtenidos en la investigación "in vitro", se suspendió la administración de NH_3 al alcanzar valores de pH de 8.4 ante la destrucción de los microorganismos del líquido ruminal. De lo expuesto se puede concluir que en los casos experimentales "in vitro", si el pH del líquido ruminal no sobrepasa valores de 8.4, existen posibilidades de recuperación de la microflora y microfauna, siempre que los factores ambientales sean favorables.

RESUMEN.

El complejo proceso ruminal de los bovinos, comprende una serie de factores con capacidad reguladora de las condiciones de vida de la flora y fauna del rumen, como son pH, humedad, concentración de iones, absorción, etc.

El estudio se realizó "in vitro" en rumen artificial, obteniéndose la destruc-

ción de las muestras de microflora y microfauna del líquido ruminal al alcanzar un pH de 8.5 y una concentración de 160 mg. de NH_3 por 100 cc. de líquido ruminal.

RECOMENDACIONES.

El complejo formado por rumen-microflora y microfauna realiza funciones de digestión, nutricionales y de síntesis vitales, para la supervivencia del rumiante, por lo cual, tanto las características fisiológicas de movilidad y de absorción del rumen, como vitalidad y viabilidad de los microorganismos, son indispensables para un normal desarrollo de los procesos digestivos.

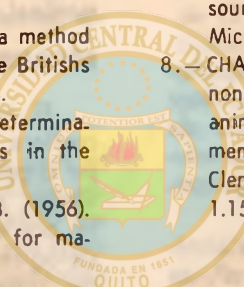
En el problema de la reconstrucción del líquido ruminal, se recomienda la inoculación del material ruminal de bovinos adultos sanos, en los cuales se debe preferir la fracción líquida por ser la que mantiene en suspensión la mayor proporción de microorganismos.

Se recomienda, además, un tratamiento simultáneo compuesto por tónicos generales y ruminatorios, a fin de restaurar las funciones fisiológicas del rumen.

BIBLIOGRAFIA.

1. — ABBOU AKKADA, (1950). Biochem. Changes in components of rumen in calves. Pág. 34—40.

- 2.—SIDWELL, C. G. (1966). Studies of the chemical composition of bull rumen. Pág. 175.
- 3.—PERK, K. and LOBL, K. (1966). A comparative study on the sera and lipids in two breeds of cattle. Págs. 115, 411—415.
- 4.—LEWIS, D. (1962). Observations on a method for determining the ammonia. The British Veterinary Journal. Págs. 46—86.
- 5.—BARNETT, N. y REID, O. (1963). Determination of microorganisms quantities in the artificial rumen. Págs. 390—405.
- 6.—KILTHOFF, I. M. y SANDELL, E. B. (1956). Estimates of the energy required for maintenance by adult ruminants. 2 Grazing bull, en Anim. Prod. 5 (1963). Págs. 11—16.
- 7.—PUERSER, D. B. (1972). Nitrogen metabolism in the rumen: Microorganisms as a source of protein for the ruminant animal. Michigan State University. Pág. 988.
- 8.—CHALUPA, W. (1972). Metabolic aspects of nonprotein nitrogen utilisation in ruminant animals. Faculty of Nutrition and department of Dairy Science Clemson University, Clemson, South Carolina, USA. Págs. 1.152. 1.155.



ÁREA HISTÓRICA
DEL CENTRO DE INFORMACIÓN INTEGRAL