

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EFFECTO DE CUATRO POTENCIALES PREBIÓTICOS SOBRE EL pH EN UN
MODELO IN VITRO DE ACIDOSIS RUMINAL**

Por

**Alexander Sebastián MOLINA MAIDANA
Santiago PAZ COSTA**



**TESIS DE GRADO presentada como
uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: MEDICINA VETERINARIA**

MODALIDAD: ENSAYO EXPERIMENTAL

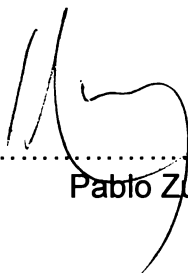


FV-29488

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2011**

Página de aprobación
Tesis aprobada por:

Presidente de la mesa



Pablo Zunino

Segundo miembro (tutor)



Ariel Aldrovandi

Tercer miembro

Alejandro Britos

Tercer miembro

Martín Aguerre


Fecha20/07/2011.....

Fecha30/03/2012.....

Autores:

Alexander Sebastián Molina Maidana

ARIA

8(odo) 

Santiago Paz Costa

29488

Tabla de contenido

Página de aprobación	2
Lista de cuadros y figuras.....	4
Resumen	5
Summary	5
INTRODUCCIÓN.....	7
REVISION BIBLIOGRAFICA	8
Acidosis ruminal	8
Técnica de producción de gas – in vitro	14
Probióticos, Prebióticos y Simbióticos	16
OBJETIVOS.....	19
Objetivo general:.....	19
Objetivos específicos:.....	19
HIPOTESIS.....	19
MATERIALES Y METODOS	21
Diseño experimental:	22
Análisis estadístico:	23
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	31

Lista de cuadros y figuras

Cuadro 1. Composición de la saliva artificial utilizada (para 1 L)	21
Cuadro 2. Solución de minerales traza (para 1 L) - componente de la saliva artificial (ver cuadro 1)	22
Figura 1. Efecto de SCI dosificada en tres niveles en la dinámica de pH en los sistemas de fermentación.....	23
Figura 2. Efecto de la inulina dosificada en tres niveles en la dinámica de pH en los sistemas de fermentación.	24
Figura 3. Efecto del sorbitol dosificado en tres niveles en la dinámica de pH en los sistemas de fermentación.	25
Figura 4. Efecto del ácido málico dosificado en tres niveles en la dinámica de pH en los sistemas de fermentación.....	26
Figura 5. Valores de pH entre las sustancias estudiadas y el tratamiento control, a distintas dosis de aditivos	27
Figura 6. Valores de pH entre las sustancias estudiadas y el tratamiento control, a distintos tiempos de fermentación	28



Resumen

La acidosis ruminal subaguda (SARA) afecta la salud animal y el desempeño en sistemas productivos intensivos y semi intensivos con serias repercusiones económicas a nivel del rodeo y a nivel nacional en general.

Desde la década pasada se han buscado estrategias alternativas para resolver distintas patologías tanto en humanos como en animales en sustitución de la administración de compuestos antimicrobianos, las que incluyen prebióticos y probióticos.

En este trabajo, se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar el efecto de cuatro sustancias posiblemente utilizables como prebióticos (cultivos inactivados de *Saccharomyces cerevisiae*, como fuente de manano-oligo sacáridos, ácido málico, inulina y sorbitol), mediante la modulación de la biota bacteriana ruminal que influye en el pH.

Se encontró que la levadura inactivada tuvo el mejor efecto modulador a lo largo del tiempo (hasta las 12 hs de fermentación) mostrando diferencias significativas con el tratamiento control de acidosis, pero sin diferencias significativas entre las dosis utilizadas. Otro tratamiento se comportó de forma similar (sorbitol), pero hasta las 4hs, aunque luego el pH descendió bruscamente.

Los tratamientos correspondientes al ácido málico, tuvieron un comportamiento opuesto al esperado.

El uso de fermentadores estáticos durante corto tiempo (24hs), utilizando el pH como variable respuesta, resultó útil en este estudio de simulación de acidosis ruminal.

Se necesitan estudios *in vivo*, para poder corroborar los resultados y el comportamiento de los prebióticos anteriormente citados, en un ambiente ruminal que se enfrente a dietas altamente acidóticas y evaluar su efecto amortiguador y regulador de pH.

Summary

Subacute ruminal acidosis (SARA) affects animal health and production performance in intensive and semi-intensive productive systems and it causes severe economic impact, both at rodeo and national scales.

Over the past decade they were looked for alternative strategies in order to heal various diseases in both humans and animals instead of administration of antimicrobials. Among those, were included prebiotics and probiotics.

We performed an *in vitro* assay to evaluate the effect of different substances which could be used as prebiotics (inactivated cultures of *Saccharomyces cerevisiae*,

as a source of mannan-oligo-saccharides, malic acid, inulin and sorbitol), through the modulation of ruminal bacterial biota affecting pH.

It was found that inactivated yeast had the best modulating effect over time (up to 12 hours of fermentation), showing significant differences with the control of acidosis, but no significant between the doses used. Another treatment behaved similarly (sorbitol), but after 4 hours then the pH decreased sharply.

Treatments for malic acid, had a different pattern than expected.

The use of static fermenters for a short time (24 hours) using the pH as the response variable was useful in studying simulated ruminal acidosis.

Further in vivo studies to should be performed in order to demonstrate the performance and behavior of these prebiotics in the rumen environment, preventing highly acidotic diets effects and assessing their buffering and pH regulating role.

INTRODUCCIÓN

El rumen, alberga e interactúa con una compleja mezcla de microorganismos. En él se dan múltiples relaciones bióticas y se establecen diversos equilibrios metabólicos entre distintos grupos de microorganismos y el huésped. Es un ecosistema auto contenido abierto que tiene como productos de entrada los alimentos y como compuestos de salida ácidos grasos volátiles, NH_3 , CH_4 , nitrógeno proteico y otros, es decir los nutrientes que el animal necesita y algunos productos metabólicos de desecho (Hungate, 1996; Osborne y Dehority, 1989; Beach y col., 2005).

La dinámica ruminal de los alimentos explica gran parte del comportamiento digestivo en los rumiantes y por lo tanto su resultado productivo final. En estos animales, el rumen representa aproximadamente 1/7 de la masa corporal y mantiene en su interior determinadas condiciones de anaerobiosis, temperatura y humedad que lo hacen una cámara de fermentación ideal (Rusell y Hespell, 1981). En condiciones normales el sistema mantiene estable su pH gracias a la capacidad tampón de los componentes de la saliva del animal, tiene un eficaz mecanismo de eliminación de los productos que en él se generan (NH_3 , ácidos grasos volátiles) gracias al poder de absorción de sus paredes y permite una renovación continua del contenido gracias al aporte de sustratos a través de los alimentos y al pasaje de los elementos sólidos y líquidos a los tramos posteriores del aparato digestivo (Van Soest, 1994; Sauvant y col., 1999).

La baja correlación entre la concentración de AGV y el pH ruminal (Sauvant y col., 1999), indica que otros factores ajenos a la concentración de AGV son importantes en la determinación del pH. Entre ellos, la capacidad tampón del medio ruminal juega un papel fundamental, el cual depende de tres factores principales: la cantidad de saliva segregada; la capacidad tampón intrínseca de los alimentos ingeridos y la capacidad tamponante de los productos de fermentación (fundamentalmente amoníaco).

La saliva aporta la mayor proporción de la capacidad tamponante del rumen. Dicho aporte depende del volumen total de saliva producida y de su composición. La saliva contiene iones fosfato y bicarbonato como sustancias tampones principales. Aunque el potencial tamponante del fosfato y el bicarbonato de la saliva es de 15 - 25 y de 5 - 60 meq/L, respectivamente, en las condiciones de pH ruminal normal (pH = 6,2), el bicarbonato (pKa = 6,1) juega un papel mucho más importante que el fosfato (pKa = 7,2) (Sauvant y col., 2006).

En consecuencia, y en las condiciones normales, la capacidad tamponante de la saliva depende en gran medida del volumen de saliva producido (Sauvant y col., 1999). observaron que existe una relación directa entre el flujo de saliva (l/kg MS ingerida) y el pH. Sin embargo, cuando el pH disminuye a 5,5, la capacidad tamponante del sistema bicarbonato-fosfato del rumen queda saturada.

La producción total de saliva es muy variable (entre 5 y 20 l/kg MS ingerida) dependiendo de la cantidad, composición y tipo de ración (Sauvant y col., 1999). El factor determinante parece ser el tiempo de masticación y rumia, ya que la cantidad media de saliva segregada por minuto de masticación permanece relativamente

constante e independiente del tipo de alimento. El tiempo empleado para la masticación y rumia depende del contenido de fibra, de tal manera que a mayor contenido en fibra, mayor tiempo de masticación, y en consecuencia mayor secreción de saliva. Además, la forma de presentación del forraje juega un papel fundamental en la cantidad de saliva segregada, siendo mayor en el heno, intermedio en el ensilado y el pasto, y bajo en forraje en forma de pellet. Por último, el tamaño de partícula también afecta al tiempo de masticación y rumia, con el consecuente efecto sobre la secreción salivar.

Los desequilibrios entre los grupos de microorganismos debidos a los cambios en la alimentación, traen repercusiones sanitarias y productivas (Nocek, 1997; Weimer, 1998; 2006; Yang y Beuchemin, 2006).

Enemark en su revisión sobre la acidosis ruminal en el año 2003 postuló que en EEUU un 19% de las vacas en temprana lactación y 26% en mitad de la lactancia tienen SARA. Se ha estimado que las pérdidas económicas asociadas a este padecimiento son de U\$S 500 millones al doble, por año (Enemark, 2003).

El estudio de la acidosis ruminal puede ser abordado a través de varios métodos experimentales, como ser técnicas *in vivo*, *in vitro* e *in situ*. Los métodos *in vivo* tienen la ventaja de que se aproximan más a la realidad, se trabaja con animales, pero es una técnica más costosa y engorrosa, al tener que disponer de más tiempo y espacio. La técnica *in vitro* es más sencilla y menos costosa, pero simula la realidad de una manera limitada.

Chenost (2001) publicó que la técnica de producción de gas es utilizada cada vez más para estudiar el comportamiento de los microorganismos ruminales, por lo que en este trabajo se adoptó esta técnica y la utilizamos como modelo para nuestro estudio experimental.

Un modelo experimental es un sistema simplificado que reproduce de manera razonable lo que se pretende estudiar. En la actualidad no hay modelos experimentales *in vitro* adecuados para reproducir SARA (Aldrovandi y col., 2009).

Es interesante resaltar que la técnica de fermentación *in vitro* no solo es útil para el estudio del líquido ruminal, sino que puede ser usada en diversas condiciones, e incluso para monogástricos. Podemos, a través de este método, estudiar la cinética de fermentación en diferentes especies y además es posible establecer el grado de digestibilidad de los alimentos. Sin duda que el empleo de esta técnica simplifica mucho las cosas, por un tema de espacios y de costos, haciendo que puedan llevarse a cabo investigaciones que de otra manera no serían posibles. Es una técnica que permite evaluar la cinética de fermentación y la producción de gas, pero permite también evaluar el pH, variable que cumplió la discusión de nuestro trabajo.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Acidosis ruminal

Es un padecimiento de los rumiantes que cursa según el grado de gravedad, con cambios en el pH ruminal con consecuencias microbiológicas y metabólicas que limitan el aprovechamiento de los alimentos, con trastornos digestivos que

pueden incluir disminución de la motilidad ruminal, estasis ruminal, heces blandas, ruminitis e hiperqueratosis (Nocek, 1997. Keunen y col. 2002). También y como consecuencia de los cambios mencionados puede haber otras repercusiones por la producción de sustancias tóxicas que pasan al torrente sanguíneo y ejercer su efecto negativo a distancia provocando liberación a la sangre de endotoxinas y padecimientos tales como abscesos, laminitis y otros trastornos locomotores. (Nocek, 1997; Gozho y col. 2005).

Con frecuencia, la acidosis clínica se denomina acidosis láctica, ya que en estas condiciones el ácido láctico juega un papel fundamental. En condiciones normales el ácido láctico es un intermediario minoritario del metabolismo ruminal. Aunque son numerosas las bacterias que sintetizan láctico, *Streptococcus bovis* es probablemente la más importante. Sin embargo, la mayor parte del ácido láctico producido se metaboliza en el rumen, siendo *Megasphaera elsdenii* la especie que más contribuye a este proceso. En la mayor parte de los casos, el desarrollo de acidosis se debe más a la no metabolización del ácido láctico que al incremento de síntesis. El proceso suele iniciarse con la fermentación rápida de hidratos de carbono no fibrosos (HCNF) y el crecimiento de grupos bacterianos productores de ácido láctico (*S. bovis*). El desarrollo lento de las bacterias utilizadoras de láctico favorece su acumulación. Cuando el ácido láctico se acumula y el pH se reduce por debajo de 5.5, las poblaciones mayoritarias utilizadoras de láctico y la población productora de ácido láctico desaparecen, pero son sustituidas por lactobacilos productores de ácido láctico. La acumulación de ácido láctico reduce aún más el pH, entrando en un ciclo que conduce a la acidosis metabólica y a la aparición de síntomas clínicos (Calsamiglia y Ferret, 2002).

Las condiciones ruminales óptimas para la producción microbiana que no afectan la degradación de los componentes fibrosos de los forrajes se caracterizan por un pH cercano a la neutralidad (6.7-6.8), una concentración de NH_3 de al menos 5-8 mg por decilitro y de AGV, de 75-90 mmol/L con una relación acético/propiónico de 3.1/1 (Kaufmann y col., 1980; Rearte, 1992; Van Soest, 1994; Remond y col, 1995). Según Sauvart y col., (1999) el pH límite para considerar una acidosis era de 6.25 y menor a 5.5 para considerar una acidosis aguda. Otros autores consideran el valor 5.6 como límite para esta patología (Keunen y col., 2002; Gozho y col., 2005; Krause y Oetzel, 2005). Independientemente del valor que se considere, en la acidosis, el pH ruminal llega a valores inferiores a aquellos en los que la microbiota puede digerir la fibra en condiciones apropiadas. (Beauchemin y Yang, 2005).

La disminución del pH ruminal se debe a la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) acompañada por un desequilibrio en sus proporciones y además a la acumulación de ácido láctico. (Nocek, 1997; Beauchemin y Yang, 2005). Todo ello puede deberse a las características químicas (composición) de la dieta y al estado físico de los alimentos que componen la dieta. La presencia de cantidades importantes de carbohidratos fácilmente fermentables (almidones o de glúcidos simples y oligosacáridos), que son sustancias rápidamente atacables desequilibran la relación de ácidos grasos aumentando la proporción de ácido propiónico, aumenta la velocidad de producción de AGV totales y son precursores de la producción de ácido láctico (Sauvart y col., 1999; Keunen y col.; 2002; Sauvart y col., 2006).

La acidosis sub aguda es consecuencia de periodos transitorios repetidos de pH ruminal moderadamente bajos que no son suficientes para desencadenar la sintomatología clínica de acidosis. La suplementación de raciones altamente fermentables estimula el desarrollo de la mucosa ruminal que inicialmente favorece la absorción de los AGV sin embargo, en mucosas no adaptadas, la baja absorción de AGV provoca una ligera acidosis ruminal (Calsamiglia y Ferret, 2002, Sauvant, 1999). Es un desorden metabólico de importancia en ganado de alta producción como el lechero, con una presentación mucho más frecuente y una gran repercusión económica en la producción (Nocek, 1997). Las pérdidas económicas por SARA, se atribuyen no solo a los problemas de salud, sino también a los costos crecientes de la alimentación debido a la digestión pobre de la fibra y a la eficacia de una alimentación más baja (Krause y Oetzel, 2005; Firkins y col., 2006). Paradójicamente, las causas de estos trastornos provienen muchas veces por ejemplo de dietas que pueden maximizar la producción lechera o de ganado de engorde, con concentrados y forraje con fibra físicamente efectiva (FFE) baja (Beauchemin, 2000; Nocek, 1997).

El mantenimiento de un pH relativamente bajo permite el desarrollo de poblaciones de clostridios y coliformes que provocan una inflamación de la mucosa y el desarrollo de hiperparaqueratosis, que actúa como barrera física para la absorción de AGV. La consecuencia inmediata es la acumulación de AGV y la disminución del pH ruminal. Aunque no se llegan a desarrollar síntomas clínicos, el mantenimiento de este pH reduce la digestibilidad de la ración y provoca oscilaciones en la ingestión de materia seca. En cualquier caso, el desarrollo de estrategias para la prevención de la acidosis clínica o subclínica debe considerar los factores de la ración implicados en la generación de ácido y de su neutralización o eliminación del medio ruminal. (Nocek, 1997; Calsamiglia y Ferret, 2002).

El pH normal, óptimo en el rumen oscila entre 6.2 y 7.0. De todos los factores del medio ruminal, el pH es el de más susceptible variación, y la ración es el factor más determinante de los cambios. El mantenimiento del pH ruminal es el resultado de la producción y la neutralización o eliminación de protones en el medio ruminal. En la fisiopatología de la acidosis ruminal entran en juego varios factores tanto del alimento como del manejo y el propio animal, e inclusive el ambiente (Calsamiglia y Ferret, 2002).

Mientras que las fermentaciones de hidratos de carbono no estructurales son energéticamente más eficientes, son altamente acidógenas, y su aporte debe limitarse y/o contrarrestarse con hidratos de carbono fibrosos, ya que estos aportan capacidad tamponante al medio ruminal. Sin embargo, la fibra limita la ingestión y su fermentación es energéticamente menos eficiente. La formulación de ración en los rumiantes debe buscar el equilibrio entre los niveles de hidratos de carbono con el objetivo de optimizar la ingestión de energía sin provocar alteraciones patológicas en el rumen (Sauvant, 1999; Calsamiglia y Ferret, 2002).

Los HCNF son los componentes que, por su aportación cuantitativa y su rápida degradación ruminal, contribuyen en mayor medida a los cambios de pH ruminal. El riesgo de acidosis es tanto mayor cuanto mayor sea la cantidad y la velocidad de degradación de los HCNF. El potencial acidogénico de los diferentes ingredientes depende de la velocidad de degradación de los almidones, que varía

entre especies vegetales, y puede modificarse física (molido, copos, gelatinización por calor) o químicamente (hidrólisis enzimática o ácida). Incluso, la velocidad de degradación y la degradabilidad efectiva real de los almidones son distintas (Sniffen y col., 1992; Calsamiglia, 2002).

Otro componente importante es la cantidad de almidón que aporta la ración. En raciones completas, la mayor disponibilidad de energía fermentable está altamente correlacionada con el contenido en almidones degradables en el rumen. Sauvant y col. (1999) demostraron la relación lineal negativa entre el contenido de almidones fermentables en el rumen y el pH ruminal.

La disminución del pH ruminal se debe a la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) acompañada por un desequilibrio en sus proporciones y además a la acumulación de ácido láctico (Nocek 1997; Beauchemin y Yang, 2005). Todo ello puede deberse a las características químicas de la dieta (composición) y al estado físico de los alimentos que componen la dieta. SARA cursa con un desequilibrio en la producción de AGV, los que se acumulan junto con ácido láctico, lo que produce un descenso moderado del pH ruminal, con frecuencia, crónico (Garner y col., 2004).

Se cree que el ácido láctico ruminal solo puede proceder de la fermentación láctica del almidón, maltosa, rafinosa, sucrosa, lactosa, celobiosa, fructosa y glucosa, así como del propionato derivado de la fermentación ruminal. Por tanto, la acidosis en última instancia, dependerá de los aportes de estos carbohidratos a través de la ración. En general, la fermentación de las hexosas genera más cantidad de ácido láctico que la fermentación de las pentosas. Asimismo, las fracciones solubles de los ingredientes muestran una mayor tendencia a formar ácido láctico que las fracciones insolubles. Esto explica, en parte, por qué no todos los cereales predisponen a la acidosis ruminal de la misma forma (Bach 2002).

Bach (2002) estudió trastornos ruminales con un enfoque práctico en sistemas de producción del ganado lechero. Destacó la importancia de los porcentajes de materia seca de los ensilados y afirmó que el agua o la humedad de la ración es un nutriente que suele estar frecuentemente involucrado en los cuadros de acidosis.

La mayoría de raciones del vacuno lechero contienen ensilados, y éstos suelen representar una fuente importante de la fibra de la ración. La materia seca de los ensilados varía con el tiempo, por lo que si la ración se prepara con la misma cantidad de ensilado en fresco, es muy probable que en el transcurso de las semanas la cantidad de materia seca de ensilado aportada no sea la misma. Si esto ocurre, la cantidad de fibra aportada a la ración tampoco será la misma. Si el contenido de agua del ensilado aumenta (muy típico con los ensilados en torre, y menos en los de trinchera) y se ofrece la misma cantidad en la ración, el resultado es un menor aporte de materia seca y de fibra. Este menor aporte de fibra en la ración, puede predisponer a un cuadro de acidosis ruminal. Además, las raciones muy húmedas estimulan menos la salivación, por lo que inducen una menor secreción de bicarbonato y resultan en una menor capacidad tampón del rumen (Bach, 2002).

Normalmente, los AGV se absorben a través de la pared ruminal por difusión pasiva, y por tanto a mayor gradiente de concentración entre el líquido ruminal y la sangre mayor velocidad de absorción. Además, la difusión pasiva es más eficaz cuando los AGV están en forma no disociada (carga neutra) que en forma disociada (carga ácida) (Sauvant, 1999). Sin embargo, en muchas ocasiones, la acidosis ruminal coincide con raciones muy ricas en concentrado que no estimulan la rumia disminuyendo la motilidad ruminal, por lo tanto la capacidad de mezclar y distribuir los AGV a través del líquido ruminal también disminuye. Además, durante los cuadros de acidosis el flujo sanguíneo gastrointestinal disminuye, lo que junto con la poca motilidad ruminal y el endurecimiento de la mucosa ruminal conlleva a que una relativamente menor proporción de los AGV sea absorbida lo cual acentúa aún más el cuadro acidótico (Sauvant, 1999).

Por otro lado, los AGV son absorbidos a través de la pared ruminal mediante un intercambio con el bicarbonato sanguíneo (la mitad del bicarbonato ruminal procede de la saliva, la otra mitad de la sangre). Al disminuir la absorción de AGV todavía se exagera más la acidosis ruminal, pues se pierde el efecto tampón que produce (Huntinton y col, 1981).

A pesar de las consecuencias negativas que una acidosis ruminal puede conllevar, en general se insiste en alimentar las vacas con raciones que rozan el límite de la acidosis ruminal y en muchas ocasiones producen acidosis subagudas o subclínicas. Este empeño se explica por los mejores resultados productivos que se suelen conseguir con este tipo de raciones, ya que las acidosis subagudas comportan una serie de ventajas que permiten aumentar la eficiencia productiva de las vacas. Las raciones que resultan en pH ruminales más bajos suelen ser más eficientes en el aprovechamiento energético de la ración, pues la fermentación ruminal en estas condiciones suele producir mayores cantidades de propionato y menores de acetato. La producción de acetato va ligada forzosamente a la producción de metano, lo que supone una pérdida energética ya que el metano no puede ser usado como fuente energética por el animal y es eliminado mediante el eructo.

Además, la eficiencia de síntesis de proteína microbiana aumenta conforme disminuye el pH, pues por un lado la población de protozoos del rumen disminuye (los protozoos ingieren una gran cantidad de bacterias) por otro la desaminación de los péptidos y aminoácidos (para obtener energía) también disminuye pues las bacterias disponen de suficientes fuentes de energía más eficientes que los aminoácidos o los péptidos. Además, en condiciones de acidosis ruminal la degradación de la proteína disminuye, y por tanto la cantidad de proteína no degradable de la ración aumenta. Si la proteína usada en la ración tiene un buen perfil de aminoácidos (sólo posible cuando se usa una combinación de varias fuentes de proteína), una leve acidosis puede ayudar a aportar aminoácidos a la vaca y mejorar su producción (Bach, 2002).

Russell y Chow (1993) propusieron que la inducción de la masticación, y consecuente producción de bicarbonato, facilitaba el efecto tampón mediante la dilución de los ácidos ruminales debido a un mayor ritmo de paso de los líquidos ruminales (a mayor salivación mayor cantidad de líquido entraba en el rumen, y por tanto más rápidamente lo abandonaba). Sin embargo, el efecto de la

dilución del contenido ruminal mediante la adición de líquido tiene un efecto totalmente opuesto, induciendo un descenso del pH ruminal. Al añadir agua al rumen se facilita que una mayor proporción de CO_2 esté disponible para formar HCO_3^- con la correspondiente emisión de un ión de hidrógeno (H^+).

Por ejemplo, a un pH ruminal de 6,6, la concentración de HCO_3^- debería estar cerca de los 0,51 mol/l. La dilución ruminal mediante la adición de un 20% de agua, reduce directamente la concentración de HCO_3^- en un 20% hasta llegar a 0,41 mol/l. Para que el sistema vuelva a la normalidad, es preciso que se forme más HCO_3^- a partir de CO_2 y la consiguiente producción de más ácido. Por lo tanto, no es recomendable que los animales que consuman raciones con alto riesgo de inducir acidosis consuman agua durante las primeras horas después de la ingestión de la ración (Bach, 2002).

El riesgo de acidosis es mayor en verano que en invierno debido a la ciclicidad de la ingestión que los animales experimentan durante los períodos de alta temperatura. En situaciones de temperaturas elevadas, las vacas tienden a disminuir el número de ingestas y a aumentar la cantidad de materia seca consumida en cada ingesta, con lo que el riesgo de que se acumulen grandes cantidades de AGV aumenta, y por tanto, también aumenta el riesgo de acidosis

En muchas ocasiones, forrajes de alta calidad, rápidamente degradable en el rumen puede provocar cambios en el ecosistema ruminal incluyendo una drástica disminución del pH con las consecuencias ya consideradas (Keunen, 2002).

Con frecuencia, los episodios de acidosis son consecuencia de una desincronización entre la producción de ácido y la producción de capacidad tamponante. En este sentido, la pauta de ingestión es importante. El riesgo de acidosis es mayor cuando el alimento concentrado se administra en una o dos tomas diarias, y disminuye en la administración de concentrado con collares magnéticos o en raciones completamente mezcladas. De forma similar, aquellos factores que provoquen la ingestión rápida de alimentos (limitación en el tiempo de acceso a la comida, competencia en el comedero por limitación de espacio, etc.) incrementarán la producción rápida de ácidos y el riesgo de acidosis (Sauvant y col., 1999).

En numerosas ocasiones se ha sugerido la posible participación del ácido de alimentos conservados (ensilados) en el desarrollo de la acidosis. Considerando el aporte de entre 300 y 1000 mM de ácido/kg MS de silo ingerido (Dulphy y Demarquilly, 1981), la contribución de los AGV de los silos respecto a la producción ruminal no supera, en el mejor de los casos, el 10%, por lo que no debemos considerar el aporte de ácido de los silos y alimentos conservados como una fuente acidogénica importante.

El estado físico de los alimentos, sobre todo en el tamaño de la partícula de los alimentos fibrosos, disminuye la fibra físicamente efectiva. Esto trae aparejado una disminución en las masticaciones y de la secreción salival. Por eso se pierde una buena parte del efecto tampón que tiene la saliva y repercute en la facilidad con la que disminuye el pH en los animales con esta alimentación (Sauvant y col., 1999; Beauchemin y Yang, 2005; Sauvant y col., 2006; Yang y Beauchemin, 2006).

En los *feed-lots* de Norte América se utilizan habitualmente buffers en la ración (Hutjens, 1991; Erdman, 1988), que son beneficiosos en la prevención de la acidosis (Garry, 2002). El buffer ideal debe ser soluble en agua y tener un pKa cercano al óptimo pH del líquido ruminal. El HCO_3^- (pKa = 6.25) tiene los requerimientos y es el más utilizado como buffer. Según algunos autores, debe ser agregado en los casos que la fibra de la ración sea muy baja (Erdman, 1988). Existen documentos que muestran que la adición en la ración de 150g de NaHCO_3 por día en vacas en lactación tiene un efecto positivo en la producción de leche. (Downer y Cumming, 1985). De forma similar se ha demostrado un efecto positivo en el índice de conversión y en el porcentaje de la grasa de la leche. (Erdman, 1988). El uso de buffer solo sería justificable cuando tenemos un problema de SARA, y no como uso de rutina en la alimentación de los bovinos (Enemark, 2004).

Técnica de producción de gas in vitro

Los estudios *in vivo* suelen ser dificultosos y caros con respecto a los métodos *in vitro*. Entre estos últimos, la técnica de producción de gas (PG) permite simular el proceso de digestión ruminal registrando la emisión de gas producto de la fermentación de los alimentos. Es una técnica confiable, sencilla y económica y puede ser utilizada para estimar el valor nutritivo de los alimentos (Brown y col., 2002).

Se han utilizado métodos de fermentación *in vitro*, con registro de la producción de gas, desde la década del 50 (Mc Bee, 1952). Veinte años más tarde se ha seguido utilizando el método pero con diferentes formatos, por ejemplo, el sistema publicado por Menke y col. (1979) con sustrato incubado en sistema de jeringas calibrado, donde el gas producido era medido en un periodo de 96 hs.

Wilkins (1974) describió una aproximación diferente a la cinética de la fermentación *in vitro*, en donde la fermentación se hacía en frascos sellados y el gas producido se determinaba utilizando un transductor de presión para medir la acumulación de presión en el espacio libre superior del frasco. Este principio de medir la presión con un sensor o transductor fue adoptado ampliamente como un método simple, pero sensible de determinar la cinética de la fermentación.

Al principio se utilizaron manómetros por desplazamiento de agua (Trei y col., 1970). De manera similar, Jouany y Thivend (1986) y Beuvink y Spoelstra (1992) utilizaron cilindros de medición invertidos para determinar el volumen de agua desplazado.

El desplazamiento directo de un émbolo mediante la fermentación de un sustrato de alimento en una jeringa de vidrio fue desarrollado por Czerkawsky y Breckenridge (1975) y fue la base para el "Hohenheim gas test" desarrollado más tarde por Menke y col. (1979). La técnica de las jeringas originalmente fue desarrollada para determinar la fermentabilidad final de un sustrato, a las 24 hrs, sin embargo un registro del desplazamiento del émbolo en intervalos más frecuentes también permite determinar la cinética del perfil de fermentación.

También se desarrollaron registros de presión en el espacio libre superior automáticos y semi-automáticos, como los descritos por Pell y Schofield (1993), Mauricio y col. (1999) y Davies y col. (2000).

Las técnicas *in vitro* son herramientas útiles para estimar el proceso de digestión de los alimentos y el valor energético. En principio consisten en incubar una cantidad conocida de alimento en un medio anaeróbico constituido por un extracto de líquido ruminal, solución nutritiva (macro y micro minerales) y una solución buffer que simula la acción de la saliva animal tamponando el sistema. Las muestras son incubadas a 39 °C y como consecuencia del proceso de fermentación se producen AGV, gases, protoplasma microbiano (como consecuencia del crecimiento de los microorganismos ruminales) y queda un residuo del alimento no digerido.

La técnica de PG *in vitro*, predice la digestión a partir de la medición del gas producido durante la fermentación. Una importante ventaja de ésta técnica es que el gas producido se puede medir en forma sucesiva sobre la misma unidad de medición (frasco de fermentación) de modo que el proceso digestivo puede ser monitoreado en el tiempo. Este gas está directamente relacionado con la desaparición de sustrato. Sin embargo, la técnica presenta inconvenientes cuando se intenta trabajar a distintos pH ruminales debido a la PG indirecta generada por el desplazamiento del sistema buffer (Cone, 1998).

El gas es medido en el espacio libre y puede realizarse la medición en tiempos predeterminados o al alcanzar determinados umbrales de presión. Un gran inconveniente es que al alcanzar un umbral, se altera la producción de gas, afectando la dinámica de fermentación, aunque algunos autores afirman que esto es solucionado al aumentar en algunos mililitros el espacio libre del frasco (Pedraza, 1998).

Dentro de los factores que afectan la cinética de fermentación se encuentran la cantidad de sustrato disponible para la fermentación, el tamaño de la población microbiana y la actividad de la misma. Esto ha sido demostrado tras el uso de diferentes modelos para describir la cinética de producción de gas (Beuvink y Kogut, 1993; Schofield y col., 1994).

La mención de producción de gas para evaluar forrajes adquirió notoriedad a partir del momento en que Menke y col. (1979) reportaran altas correlaciones entre los valores de producción de gas *in vitro* y la digestibilidad aparente *in vivo*. También fueron observadas fuertes correlaciones con los valores de energía metabolizable de los alimentos determinados *in vivo* (Menke y Steingass, 1988).

La cantidad de gas producido por el sustrato en la incubación *in vitro* está relacionada con la digestibilidad y consecuentemente con el valor energético. (Pedraza, 1998).

El modelo consta de un sustrato, inóculos, aditivos y un medio de tamponamiento, con condiciones iniciales de pH y anaerobiosis, entre otras. Siempre la variable respuesta ha sido la producción de gas, pero se han usado otras variables como respuesta inicial y final, como la producción de AGV y el pH (Callaway y Martin, 1996).

Como resulta evidente, la cantidad de gas acumulado *in vitro* tiene dos fuentes: la PG directa proveniente de la fermentación de los alimentos, los cuales producen ácidos grasos de cadena corta, CO₂ y metano (CH₄), y la PG indirecta

correspondiente al CO₂ liberado por el desplazamiento del bicarbonato (HCO₃) como consecuencia de la acumulación de AGV (Beuvink y Spoelstra, 1992; Rymer y col., 2005).

Cuando las incubaciones se realizan a pH ácidos (menores a 6,8) o con materiales fermentados, la técnica presenta inconvenientes, ya que la acidez proveniente del alimento o generada en forma artificial aumenta la PG como consecuencia de la contribución indirecta de gas (Beuvink y Spoelstra, 1992; Jaurena, 1998).

Sería deseable que el sistema buffer minimice la PG indirecta de forma de no distorsionar la interpretación de los resultados. Para esto es necesario que el buffer no contenga bicarbonato en su composición. Por otra parte, el consumo del ácido cítrico genera dificultades para mantener el pH (Mould y col., 2000).

Hay que tener en cuenta que el líquido ruminal no solo aporta microorganismos sino también AGV y sustratos digeribles, de modo que puede contribuir con PG que no está asociada con el alimento evaluado. Por ésta razón se realiza una corrección restando el gas producido por un blanco (Cone, 1998), el cual es una botella que contiene medio de cultivo e inóculo sin muestra. Cuando la dilución del líquido ruminal es grande, es probable que no corregir por blanco sea mejor ya que la PG proveniente de la materia orgánica contenida en el líquido es mínima. (Cone, 1998).

Probióticos, Prebióticos y Simbióticos

Probióticos:

Aunque se han propuesto varias definiciones de probióticos, la más ampliamente aceptada en la actualidad establece que es un suplemento alimentario microbiano vivo que administrado en cantidades adecuadas puede ejercer beneficios al animal (Collins y Gibson, 1999). Son microorganismos no patógenos, generalmente originarios de la biota del huésped al que benefician, los cuales al ser ingeridos vivos como monocultivos o en cultivos mixtos, ejercen una influencia positiva en la salud y la fisiología del huésped (Marteu y Seksik, 2004).

Un probiótico es un suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta en forma beneficiosa al huésped fomentando su equilibrio intestinal microbiano. Los probióticos más comunes son bifidobacterias, lactobacilos o levaduras (Roos y Katan, 2000).

Estudios clínicos demostraron que algunos probióticos específicos previenen la diarrea asociada a antibióticos y la diarrea del viajero, y reducen la severidad de la diarrea por rotavirus en seres humanos (Roos y Katan, 2000).

La actividad innata β -galactosidasa de los lactobacilos puede aliviar además los síntomas de la intolerancia a la lactosa (De Vrese y col., 2001). La evidencia clínica disponible apoya la hipótesis que los probióticos pueden ser beneficiosos en la prevención y el tratamiento de la diarrea alimentaria.

Más recientemente, varios investigadores se han interesado en el uso de microorganismos seleccionados (Direct-Fed Microbial: DFM), que al modificar la

biota ruminal provoca efectos favorables para el huésped, evitando problemas como la acidosis ruminal y el meteorismo y ayudándolo en su desempeño productivo (Newbold y col., 1995; Ghorbani y col., 2002; Beauchemin y col., 2003).

Prebióticos

En 1995 Gibson y Roberfroid definieron los prebióticos como ingredientes no-digestibles por el huésped, que afectan en forma beneficiosa a éste mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de un número limitado de especies de bacterias.

A diferencia de los probióticos, que tienen que llegar viables y en cierta cantidad al lugar de acción, en este caso al rumen donde tienen que adaptarse a un ecosistema existente (Weimer, 1998), un prebiótico promueve selectivamente el crecimiento de grupos específicos de la microbiota originaria (Gibson y Roberfroid, 1995).

Los beneficios de salud de los prebióticos se relacionan con sus propiedades específicas de indigestibilidad, fermentabilidad y selectividad en promover el crecimiento de bacterias beneficiosas (Roberfroid, 2001).

Los prebióticos tienen la finalidad de modificar la microbiota ruminal de tal manera que las actividades bacterianas beneficiosas para el huésped son estimuladas y las actividades bacterianas adversas para la salud del huésped son suprimidas (Jouany y Ushida, 1998; Gorbhany y col., 2002).

Las propiedades de fermentación de los prebióticos se ven influenciadas por su composición en monosacáridos, su unión glucosídica y su peso molecular. La mejor forma de comparar los prebióticos (oligosacáridos) es con técnicas *in vitro*, de las que existen varias aproximaciones (Mc Carthy y Rastall, 2003).

Los FOS (fructooligosacáridos), como la inulina y la oligofruktosa, son carbohidratos indigestibles que naturalmente están presentes en los espárragos, cebollas y achicorias (Gibson y Roberfroid, 1995, Roberfroid, 1996).

Aunque la mayor parte de las investigaciones en humanos se hizo sobre la inulina y los FOS, también fueron testeados en relación a sus efectos prebióticos otros oligosacáridos no digeribles como los xylooligosacáridos, galactooligosacáridos, mananoligosacáridos e isomaltoligosacáridos. La mayoría de los candidatos a prebióticos son oligosacáridos, pero también incluyen polisacáridos (Blaut, 2002).

Gibson y Roberfroid (1995) investigaron los patrones de fermentación de varios oligosacáridos y llegaron a la conclusión que todos pueden ser considerados como nutrientes. Sin embargo sólo los FOS y en particular la inulina cumplieron los criterios de prebiótico. Un estudio en personas con ileostomías que consumían oligofruktosa (15, 5 g/día) o inulina (17g/día) demostró un grado de recuperación en los líquidos de la ileostomía de un 88-89%, indicando un alto grado de indigestibilidad (Ellegard y col., 1997).

La fermentación de los FOS resulta en la proliferación de bifidobacterias (Wang y Gibson, 1993). Esto fue confirmado por estudios *in vivo* durante los cuales la suplementación con 15 g/día de oligofruktosa resultó en un incremento de bifidobacterias y una reducción de *Clostridium sp.* y *Fusobacterium sp.* (Gibson y col, 1995). Se piensa que esta selectividad se debe a que las bifidobacterias tienen la enzima β -fructosidasa que va a separar las uniones glucosídicas β 1-2 de los FOS. (De Vries y Southamer, 1967). Los monómeros producidos de esta hidrólisis

(glucosa y fructosa) entonces son utilizados por las bifidobacterias como un sustrato para la fermentación.

En terneros hay ensayos con inulina que muestran efectos similares a los encontrados en monogástricos, mejorando la performance de crecimiento y la consistencia de la materia fecal. Los rumiantes adultos no tienen recursos enzimáticos para atacar estas sustancias (inulina y FOS, entre otros) aunque la biota ruminal es capaz de degradarla completamente (Van Loo, 2007).

El uso de otros oligosacáridos, como los mananoligosacáridos (MOS) ha mostrado efectos prebióticos en animales domésticos, tales como reducción de microorganismos patógenos, como *Salmonella spp.* y *E. coli* (Spring y col., 2000). La fuente más común de mananoligosacáridos es la pared de *S. cerevisiae* (Spring y col 2000, Lipke y Ovalle, 1998). También estudios en rumiantes demuestran que son hidrolizados por algunas bacterias del rumen (Williams y col., 2005).

Los alimentos funcionales son definidos como un componente de la dieta que puede tener efectos fisiológicos sobre el consumidor y que pueden llevar a una mejora justificable de la salud (Roberfroid, 1996). Debido a la diversidad de especies y sus capacidades metabólicas de la microflora la fermentación en el intestino es un proceso complicado donde productos metabólicos finales excretados por una especie pueden servir como sustrato de crecimiento para otra. En general la fermentación bacteriana en el intestino puede tener ya sea efectos promovedores de la salud (p. ej. la producción de metabolitos “protectivos” como el butirato) o nocivos (p. ej. producción de toxinas o carcinógenos). Por esto existe un potencial para modificar la microbiota intestinal de tal forma que los efectos beneficiosos son realzados. Esto se puede lograr por el uso de probióticos (Fuller, 1989) y/o prebióticos (Gibson y Roberfroid, 1995).

El uso de alcoholes polihidroxílicos, tales como sorbitol, manitol, arabinitol, xilitol y galactitol, se ha realizado con diversas finalidades sobre rumiantes, o en ensayos *in vitro*, produciendo diversos efectos moduladores sobre la biota ruminal, modificando la producción de AGV o seleccionando poblaciones determinadas de microorganismos.

Se han realizado trabajos *in vitro*, con líquido ruminal ovino y la inclusión de varios polioles (Lister, 1984), encontrándose en algunos casos modificación de la relación acetato: propionato y diferentes efectos entre los hexitales y los pentitales.

En estudios *in vitro* con líquido ruminal ovino, se ha demostrado un efecto inhibitor del sorbitol, sobre patógenos tales como la *E. coli* O157:H7 (De Vaux, 2002).

En estudios *in vivo* en ganado bovino, se utilizó sorbitol, solo o con ionóforos, con resultados variables sobre la performance carnífera de los animales (Fontenot y Huchette, 1993).

Los ácidos orgánicos fumárico, málico y aspártico, son productos intermediarios de una de las vías metabólicas (succínica) por la cual el piruvato se transforma en ácido propiónico, evitando la vía que forma lactato (Mongó, 2007). Para que bacterias como *Propionibacterium shermanii* y *Selenomonas ruminatum*

(Nocek, 1997) utilizan al ácido láctico para formar succínico, es necesaria la presencia de malato en el medio como principal estimulador (Nisbet y Martin, 1990). Otro efecto benéfico del malato, es disminuir la producción de metano (CH_4). Cuando el H_2 está disponible en el rumen, las bacterias *S. ruminatum*, pueden utilizar fumarato y malato para producir succinato y propionato.

El malato, es la sal del ácido málico (un ácido dicarboxílico) presente en la naturaleza como intermediario del ciclo de Krebs. Se encuentra con mayores concentraciones en las leguminosas (Mongó, 2007).

Se ha demostrado en estudios *in vivo* que el uso de ácido málico no afecta la función digestiva ruminal, pero que sí puede subir el pH ruminal a través del uso del lactato previamente existente en el rumen (Montaño y col., 1999).

Simbióticos

El concepto simbiótico involucra un probiótico útil incorporado a través de un vehículo alimentario apropiado y un prebiótico adecuado (Gibson y Roberfroid, 1995). Se basa en el hecho que la estructura tanto del prebiótico como de las especies bacterianas presentes en el ecosistema son factores importantes para el manejo de la microbiota intestinal y por lo tanto apunta a realzar o mejorar la supervivencia del probiótico en el medio hostil del colon ofreciéndole un sustrato de crecimiento pronto y disponible.

Son combinaciones de probióticos con prebióticos, produciendo estos últimos un efecto específico positivo sobre los primeros (Marteu y col., 2004; Tuohy y col.; 2005). Estas combinaciones garantizan la supervivencia de los microorganismos, con un sustrato específico rápidamente disponible, que además garantiza al menos un efecto benéfico para el cual el prebiótico es el precursor (Martin, 1998; Montaño y col.; 1999; Colling y Gibson, 1999; Muenya y col. 2005).

Una posibilidad interesante consiste en utilizar la glucotecnología para efectivamente diseñar y sintetizar simbióticos que consisten en un probiótico eficiente y un prebiótico, hechos a medida o especialmente para ese organismo específico (Rabiu y col., 2001).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Comparar los efectos de sustancias potencialmente preventivas de la acidosis ruminal sobre el pH en un modelo *in vitro* de fermentación, validando el pH como variable de respuesta.

Objetivos específicos:

- Evaluar el uso de potenciales prebióticos en la modulación de la biota bacteriana ruminal.
- Seleccionar el prebiótico que haya exhibido el mejor potencial para la prevención de la acidosis.
- Validar el pH como variable de respuesta, en lugar de la producción de gas, en condiciones de simulación de la acidosis ruminal *in vitro*.

HIPOTESIS

Las hipótesis planteadas en el siguiente trabajo son las siguientes.

- Diferentes sustancias (*Saccharomyces cerevisiae* inactivada, inulina, sorbitol y ácido málico) pueden ejercer un efecto modulador sobre la biota ruminal.
- El método gas *in vitro* modificado, permite mostrar el efecto modulador de la biota en condiciones experimentales que simulan la acidosis ruminal.
- El pH en este tipo de modelo experimental es de utilidad para evidenciar el mencionado efecto modulador.

MATERIALES Y METODOS

El ensayo se realizó en el campo experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria (Departamento de San José)

Modelo

Sistema de fermentación (como sustituto del rumen de los vacunos): se realizó en un frasco de vidrio color caramelo de 125 mL donde se introdujeron los ingredientes.

Como sustrato se utilizó una mezcla de gramíneas y leguminosas en estado vegetativo (forraje) y grano de cebada (50% de forraje y 50% de grano de cebada en base a materia seca), secos, molidos y mezclados, junto con un aditivo (*Saccharomyces cerevisiae* inactivado, inulina, sorbitol y ácido málico), agregado según el diseño experimental. Como buffer se utilizó saliva artificial modificada a partir de la fórmula publicada por Williams y col, 2005 (Cuadros 1 y 2).

Como inóculo se utilizó líquido ruminal, obtenido de una vaca lechera canulada, alimentada con pasturas, ensilado y concentrados. El líquido se extrajo inmediatamente antes de su uso, se tamizó en una tela de queso plegada en cuatro y recogida en un recipiente térmico al que inmediatamente se lo mantuvo con CO₂ barbotando en su interior para mantener la anaerobiosis durante su uso para dosificar los frascos.

Se utilizó una solución de Na₂S al 6% como agente reductor.

En primer lugar se pusieron 500 mg de sustrato en los frascos, luego se agregaron 40 mL de saliva artificial y 0.5 mL de agente reductor bajo burbujeo de CO₂. Se tapó inmediatamente con un tapón de goma.

Los frascos se mantuvieron durante unas 6 horas en heladera para que se hidratara el sustrato. Luego se sacaron y se colocaron en los baños termostáticos, a 39 °C, para que su temperatura se aproximara a la del inóculo.

Se extrajo el líquido ruminal y se dosificó 10 mL en cada frasco bajo burbujeo de CO₂, para mantener el medio anaeróbico. Inmediatamente se tapó y precintó.

Los frascos se colocaron enseguida en los baños y se incubaron a 39 °C y con aguja hipodérmica se extrajo el exceso de gas producido a diferentes tiempos (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 hs) para mantener controlada la presión interna de los frascos.

Cuadro 1. Composición de la saliva artificial utilizada (para 1 L)

Ingrediente	Cantidad
KCl	0,6 g
NaCl	0,6 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,73 g
Na ₂ HPO ₄	1,775 g
Solución minerales traza (Cuadro 2)	10 mL
Solución Hemina	10 mL
Agua destilada (csp)	1 L

Solución Hemina: Se disuelve 0,1 g de Hemina en una pequeña cantidad de NaOH 0,05 M. Se lleva a 1 L con agua destilada hervida (con CO₂ burbujeando).

Cuadro 2. Solución de minerales traza (para 1 L) - componente de la saliva artificial (ver cuadro 1)

Ingrediente	Cantidad
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,025 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,020 g
ZnCl ₂	0,025 g
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,025 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,050 g
SeO ₂	0,050 g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,250 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,250 g

Diseño experimental:

Se utilizaron doce tratamientos experimentales organizados de la siguiente manera: cuatro sustancias candidatas a prebiótico (*S. Cereviseae* inactivada, inulina, sorbitol y ácido málico), cada una de ellas en tres niveles cuantitativos (3, 9 y 15 %). Como controles se añadieron uno sólo con líquido ruminal y saliva artificial y otro que reprodujo la acidosis (líquido ruminal, saliva artificial y sustrato sin aditivos). Todos los tratamientos fueron por triplicado.

De este modo se conformaron sets experimentales con un total de 42 unidades experimentales.

Se utilizó un set experimental completo para cada tiempo de medición, las cuales se hicieron a las 0, 4, 12, y 24 hs. En cada tiempo se extrajo el contenido de los sistemas de fermentación para registrar el pH por medio de phi metro digital. Se totalizaron 168 unidades experimentales.

Análisis estadístico:

En primer lugar se planteó el siguiente test de hipótesis:

- H₀: no hay diferencias en las medidas de pH entre los diferentes tratamientos.
- H_A: hay diferencia en las medidas de pH entre al menos dos de los tratamientos.

Se eligió trabajar con un nivel de significación del 5 % ($\alpha = 0.05$)

Se controló que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente con los tests de Shapiro-Wilk y de Levene

Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de la variable pH, considerando las siguientes fuentes de variación: prebióticos, dosis y tiempo.

$$Y_{aij} = \mu + P_a + D_i + T_j + PD_{ai} + PT_{aj} + \varepsilon_{aij}$$

P= Sustancia testada

D= Dosis

T= Tiempo

En los casos en que se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó el test de Tukey.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

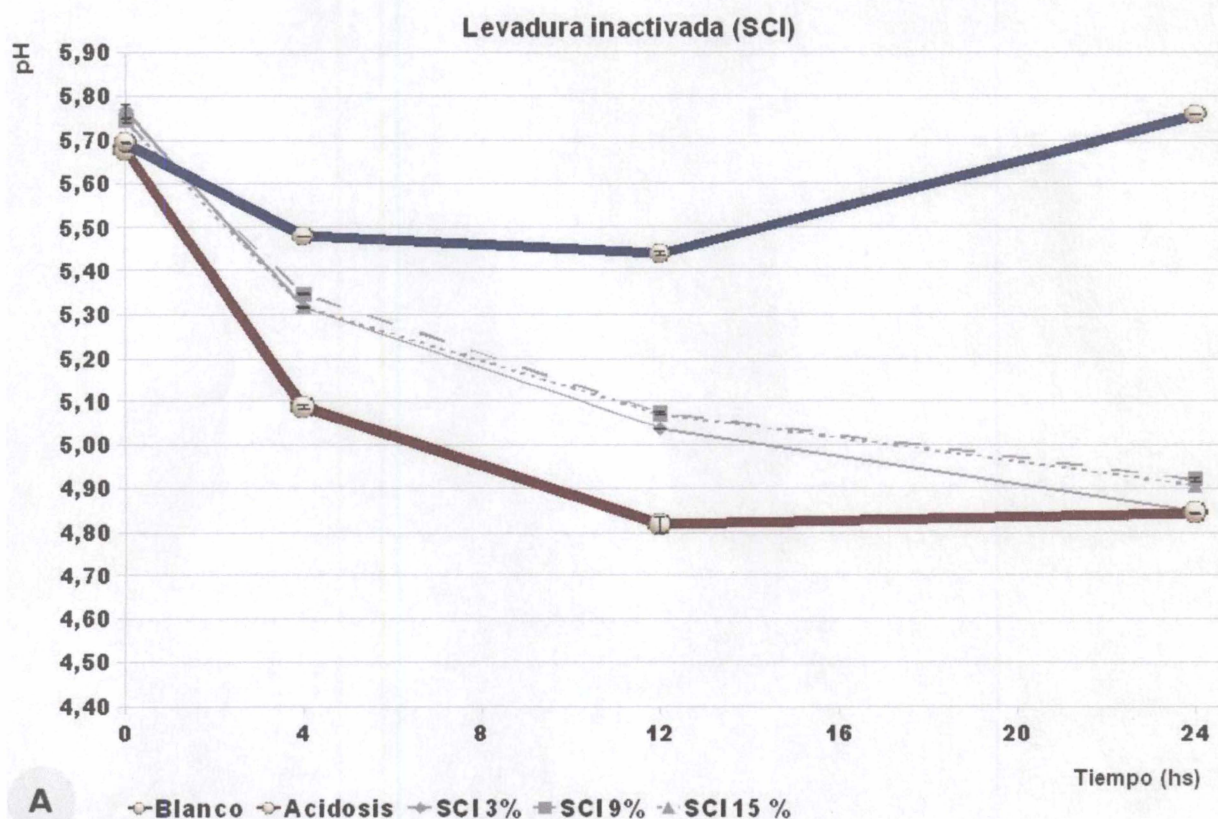


Figura 1. Efecto de SCI dosificada en tres niveles en la dinámica de pH en los sistemas de fermentación.

La figura 1 representa el comportamiento de la levadura inactivada en el tiempo en las tres dosis, 3, 9 y 15 %. Los extremos superior e inferior representan al blanco y al testigo respectivamente, siendo este último la referencia de valores muy ácidos. No se observaron diferencias significativas entre las dosis. La levadura inactivada detiene la caída del pH manteniendo los valores por encima de 5 hasta las 12 hs.

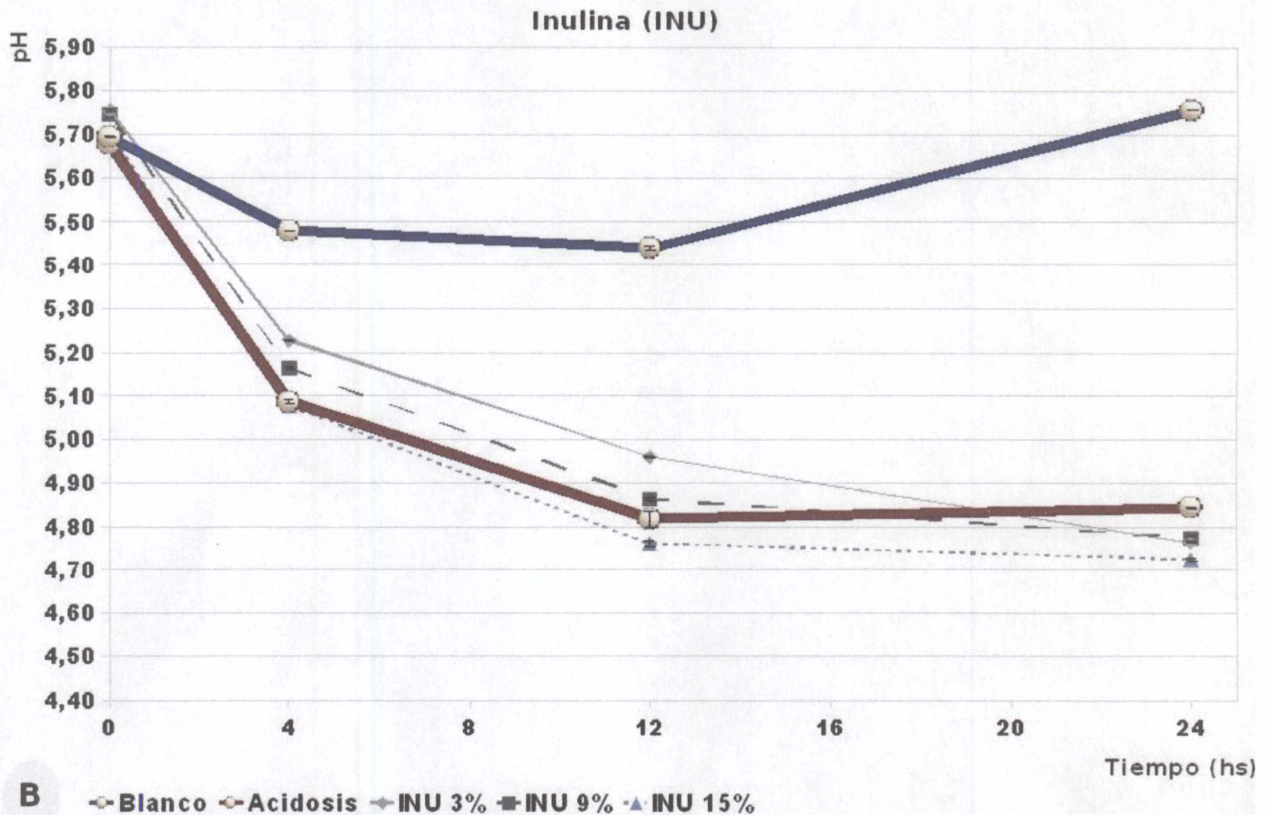
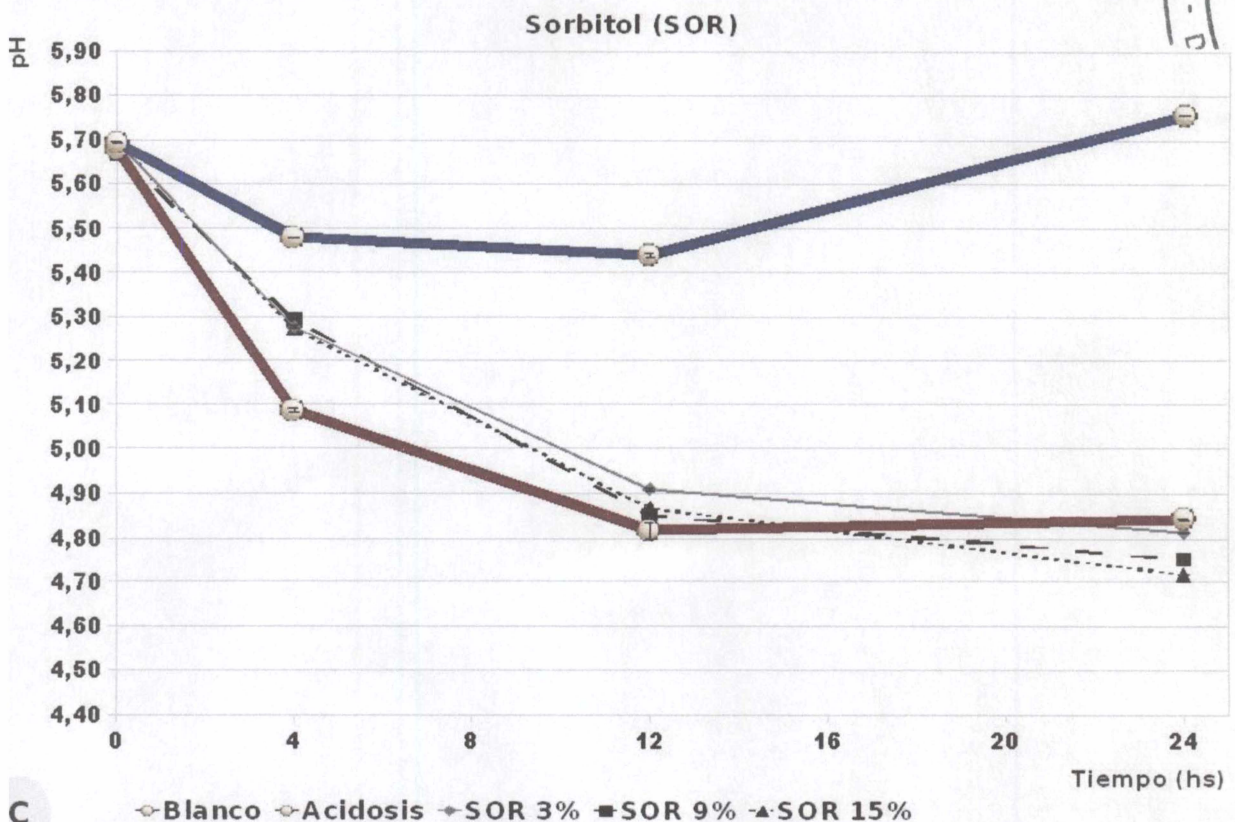


Figura 2. Efecto de la inulina dosificada en tres niveles en la dinámica de pH en los sistemas de fermentación.

En la figura 2 se aprecia el comportamiento de INU en el tiempo en las tres dosis, 3, 9 y 15 %. Los extremos superior e inferior representan al blanco y al testigo respectivamente, siendo este último la referencia de valores muy ácidos.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las dosis. Hasta las cuatro horas se mantuvo el pH hasta valores por encima de 5 pero luego siguió descendiendo. Inclusive luego de las 4 hs la dosis de 15% se encontraba por debajo del testigo.



C

Figura 3. Efecto del sorbitol dosificado en tres niveles en la dinámica de pH en los sistemas de fermentación.

En la figura 3 se muestra el comportamiento de SOR en el tiempo en las tres dosis, 3, 9 y 15 %. Los extremos superior e inferior representan al blanco y al testigo respectivamente, siendo este último la referencia de valores muy ácidos. No se apreciaron diferencias significativas entre las dosis y se mantuvieron valores de pH por encima de 5 hasta las 4 hs, luego continuó descendiendo alcanzando valores muy bajos a las 12 hs de fermentación. En torno a las 15 hs se encontraron valores por debajo del testigo.

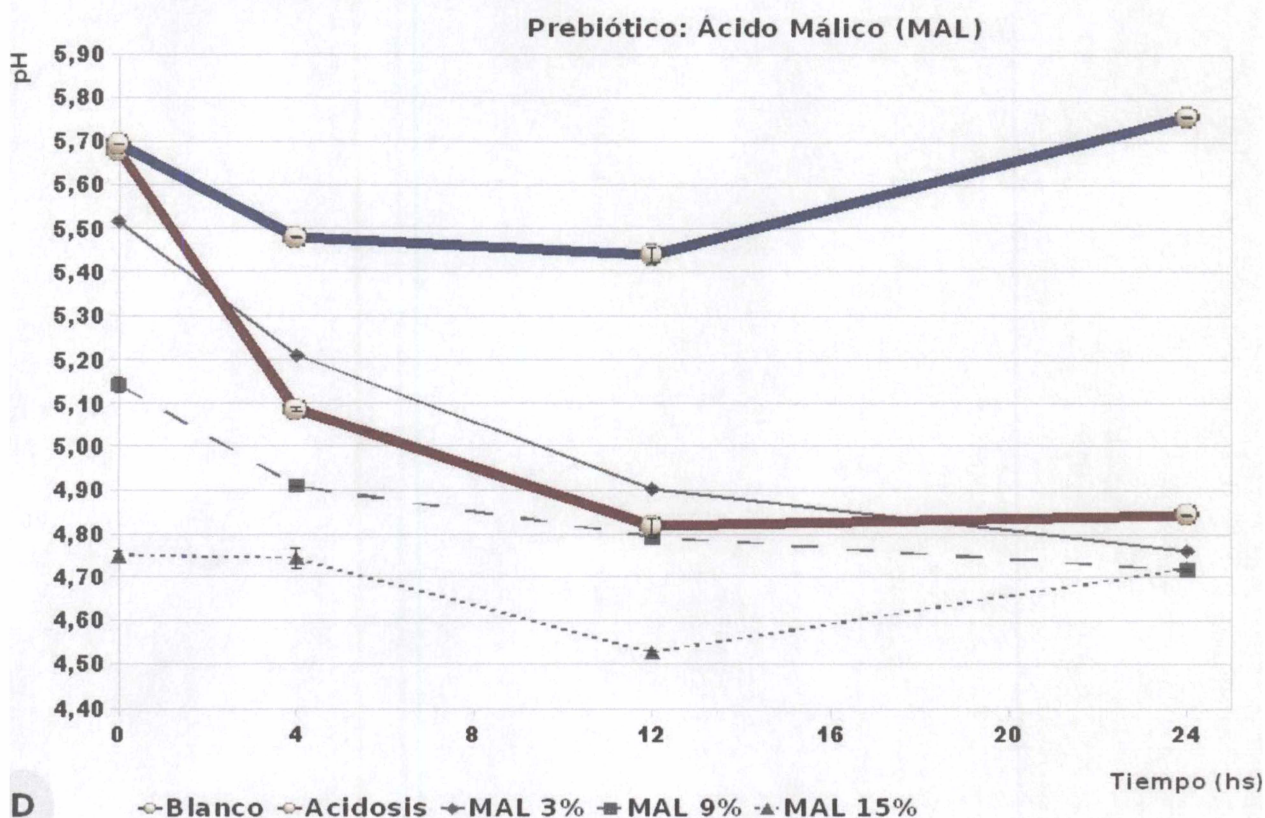


Figura 4. Efecto del ácido málico dosificado en tres niveles en la dinámica de pH en los sistemas de fermentación.

En la figura 4 vemos el comportamiento del ácido málico en el tiempo en las tres dosis, 3, 9 y 15 %. Los extremos superior e inferior representan al blanco y al testigo respectivamente, siendo este último la referencia de valores muy ácidos.

El comportamiento de este fue diferente a los demás porque se encontraron diferencias significativas entre las dosis. La dosis de 3% mantuvo el pH a valores no tan bajos hasta las 4 hs. Prácticamente todos los registros se mostraron fuera de los controles.

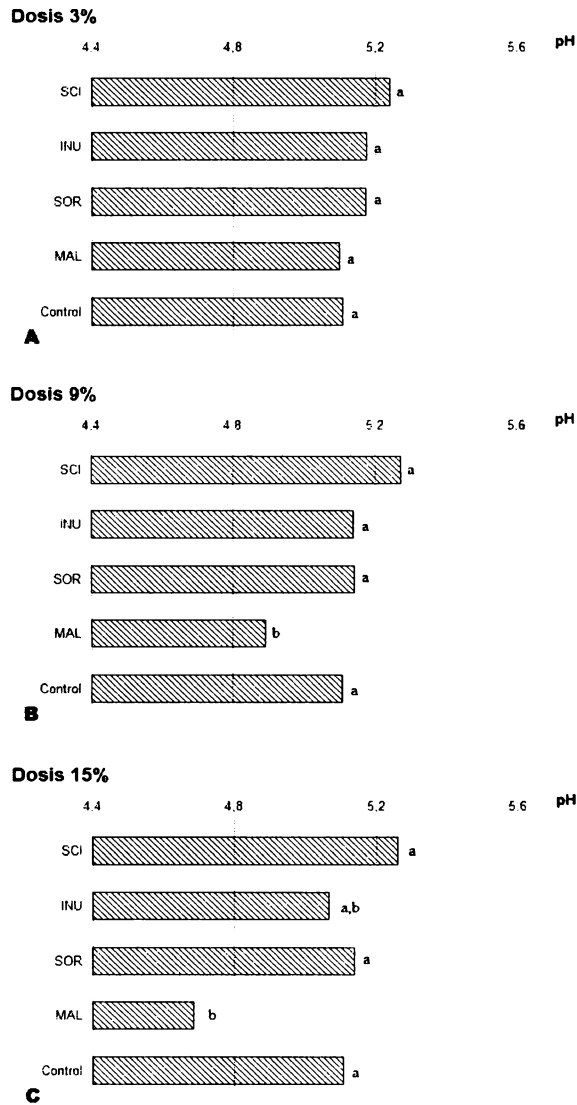


FIGURA 5. Valores de pH entre las sustancias estudiadas y el tratamiento control, a distintas dosis de aditivos.

La figura 5 compara los cuatro potenciales prebióticos con el Control, en las distintas dosis, en la dinámica de pH, sin tener en cuenta el tiempo. En las dosis de 3 y 9% no se encontraron diferencias significativas con el Control. En la dosis mayor utilizada se vieron diferencias significativas entre el Control y MAL, teniendo éste, el registro más bajo. SCI fue el aditivo que mostró los valores numéricamente más altos.

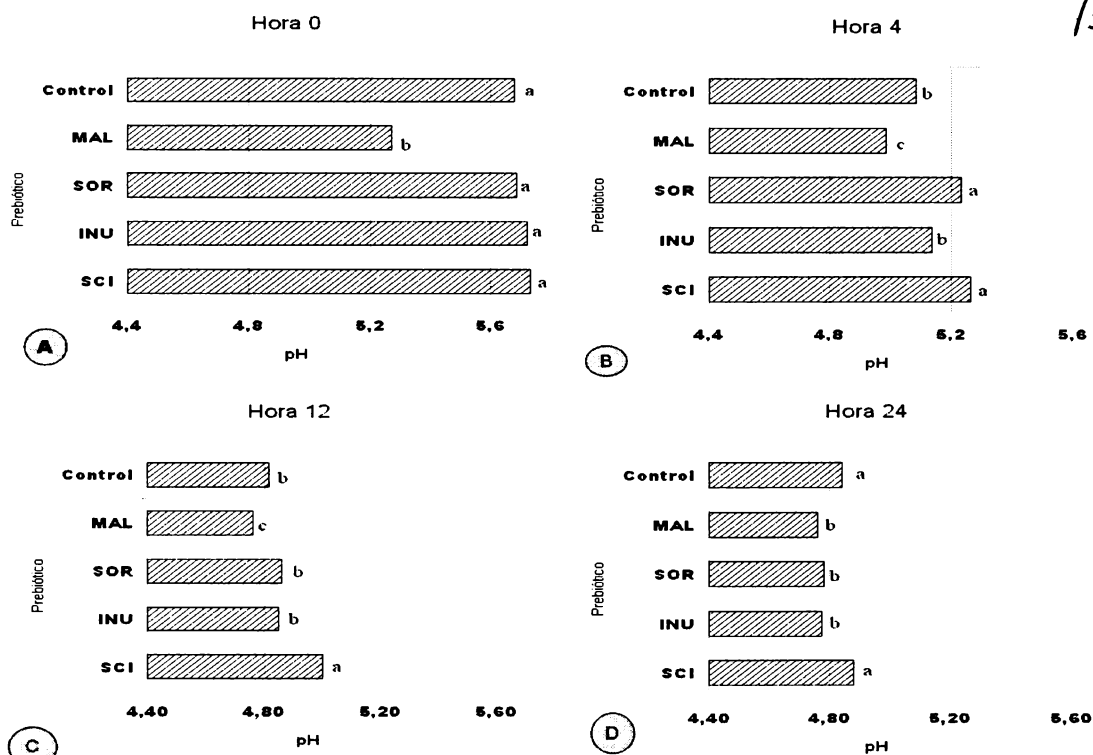


Figura 6. Valores de pH entre las sustancias estudiadas y el tratamiento control, a distintos tiempos de fermentación.

Gráfica A: tiempo 0; Gráfica B: 4 hs de fermentación; Gráfica C: 12 hs de fermentación; Gráfica D: 24 hs de fermentación

Nota: letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La figura 6 compara el comportamiento en la dinámica de pH de los cuatro potenciales prebióticos más el control, a distintos tiempos. Se observa que a la hora cero, no se encontraron diferencias con el control, salvo MAL. A la hora cuatro se ve el efecto positivo de las sustancias testadas aumentando el pH, salvo MAL que permanece por debajo del control. A las 12 hs se ve un buen efecto de SCI pero ya no tanto de SOR y de INU. MAL sigue por debajo del control. A las 24 hs solo SCI es quien está por encima del control aunque con valores muy bajos. Los demás aditivos están por debajo del control.

DISCUSIÓN

El tiempo cero de medición obtuvimos valores de Ph bajos incluso en el blanco (5,7). Esto puede deberse a que el líquido ruminal que se utilizó se obtuvo de una vaca alimentada principalmente a base de concentrados y ensilados. Cabe destacar que en el año que se realizó el ensayo estábamos saliendo de una seca muy importante y la pastura escaseaba considerablemente. Si bien los valores de Ph que manejamos son bajos, lo importante es poder observar el efecto de los prebióticos frente a un alimento muy acidótico en base a un blanco y un testigo.

Cuando se comparan las sustancias testadas con el Control en la hora cero (figura 6), no se aprecian diferencias significativas con la mayoría de ellas. Es razonable que sea así ya que recién habían sido armados los sistemas de fermentación. No obstante sí se aprecian diferencias entre MAL y el Control que ya desde el comienzo mostró valores inferiores al mismo. Esto puede deberse a que se trata de un ácido, si bien hay estudios *in vivo* que demostraron que el ácido málico puede subir el pH ruminal (Montaño y col., 1999), en nuestro trabajo obtuvimos efectos contrarios a lo esperado.

A las 4 hs de fermentación, SCI y SOR presentaron valores de pH superiores al Control, en cambio MAL se mantuvo en valores cercanos al mismo. MAL mantuvo el comportamiento de la hora cero dada su naturaleza ácida, mientras que el control reprodujo la acidosis (para estos sistemas de fermentación) al carecer de sustancias moduladoras. En realidad no sabemos de qué forma modulamos la biota ruminal, si es sobre la actividad de las bacterias que ahí existen o tal vez aumentando el número de bacterias benéficas o estimulando el crecimiento de nuevas bacterias. Sería de utilidad realizar estudios de la biota ruminal para obtener más información.

A las 12 hs son SCI y MAL quienes muestran diferencias significativas con el Control pero con efectos opuestos. MAL no cumple papel modulador mientras SCI sigue teniendo un efecto positivo en la dinámica de pH, probablemente las bacterias cuentan aun con fuente de MOS, componente estructural de *Saccharomyces cerevisiae* (Spring y col., Lipke y Ovalle, 1998). Estudios de algunos autores en rumiantes, han demostrado que bacterias del rumen hidrolizan a los MOS, estos y también se demostró que bajan la población de bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella*. Tal vez la modulación de la microbiota del rumen por parte de los MOS se deba a que varía la composición de la biota y no tanto de su actividad (Williams y col., 2005).

Cuando el tiempo supera las 12 hs de fermentación, ya no se observa un efecto positivo en la dinámica de pH, se apreciaron diferencias significativas pero con valores muy bajos.

En síntesis, hasta las 12 hs de fermentación habría efectos positivos de algunas sustancias (p. ej.: SCI). Esto podría deberse a la vida media de los potenciales prebióticos en los sistemas de fermentación y tal vez si se dosificara en cortos tiempos habría buenos resultados. También hay que tener en cuenta que es un sistema estático, es decir que en entre otras cosas, no hay aporte nuevo de saliva como pasa en los rumiantes.

El principal efecto para este ensayo fue sin duda el tiempo, ya que a distintas dosis no fue relevante su efecto sobre el pH.

Teniendo en cuenta que no se apreciaron diferencias significativas entre las diferentes dosis, podría ser usada la mínima como dosis efectiva. Tal vez dicha dosis pudiera ser incluso menor a la que se ensayó en esta oportunidad. Al respecto, en trabajos posteriores podría testarse una dosis menor para comprobar su efecto modulador de la biota y así realizar ensayos *in vivo* para demostrarlo. La inulina es un FOS y es de rápida degradación, fermentando rápidamente y produciendo grandes cantidades de AGV. Tal vez el mejor efecto de la inulina como modulador de la biota ruminal sea a dosis más pequeñas aun.

Podría ser de utilidad práctica utilizar SCI según estos resultados, pero tal vez reconsiderando la dosis. Un 3 % de la ingesta de un bovino, aún en base Materia Seca, es una cantidad considerable para un aditivo, por lo que la dosis al 3 % sigue siendo demasiado elevada. Esta ha demostrado efectos

Probablemente se podría bajar aún más la concentración de SCI y encontrar una estrategia para prevenir SARA, aún más económica, más ajustada a la realidad fisiológica de consumo e igual de efectiva.

CONCLUSIONES

En conclusión, podemos decir que de las sustancias usadas como potenciales prebióticos, SCI es la que logra mantener más alto y por más tiempo el pH en el diseño experimental, diferenciándose en forma significativa del control que simula la acidosis ruminal.

Esto permite pensar que podría funcionar como un prebiótico preventivo de la acidosis ruminal, utilizado en condiciones similares a las experimentales. Ya que no se observaron diferencias significativas entre las dosis, podríamos decir que dosificando SCI, en dosis de 3% (la más baja), se lograría modular la biota ruminal durante unas 12 hs.

Al dosificar SCI cada 12 hs estaríamos en condiciones óptimas para mantener un buen ambiente ruminal en cuanto al pH y así mantener vivas las especies de bacterias de interés para la degradación del alimento y finalmente obtener buenos resultados productivos sin alterar la salud del animal.

Para verificar estos postulados habría que realizar estudios *in vivo*.

El método de fermentación *in vitro* en frascos, con mediciones de pH, tiene una gran ventaja frente a otros, ya que es más económico y bastante sencillo de utilizar.

Según nuestro trabajo, este método resultó de interés para estudiar la acidosis ruminal y evaluar potenciales estrategias correctivas.

Si bien, la medición de gas ha sido un buen indicador de la cinética de fermentación ruminal, como lo demuestran innumerables trabajos publicados a nivel nacional e internacional, el pH resultó de utilidad, como variable de respuesta, para evidenciar el efecto modulador de la biota ruminal en un modelo experimental de acidosis ruminal simulada.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Albane de Vaux, M. Morrison, R. W. Hutkis. (2002)** Appl. Env. Microbiol. 68.2.519-254.
2. **Aldrovandi. A.; Molina. A.; Paz. S.; Cajarville. C.; Zunino. P. (2009)** Aproximación a un modelo experimental *in vitro* para estudiar la acidosis ruminal subaguda. XXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, 11 y 12 de junio del 2009.
3. **Bach. A. (2002)** Trastornos ruminales en el vacuno lechero: un enfoque práctico. XVIII curso de especialización FEDNA, Barcelona, 4 y 5 de noviembre del 2002; P. 119-139.
4. **Bach,A.; Calsamiglia, S.; Stern, M. D. (2005)** Nitrogen Metabolism in the Rumen. J. Dairy Sci. 88:(E. Suppl.):E9 E21.
5. **Beauchemin, K. A.; Yang, W. Z.; Morgavi, D. P.; Ghorbani, G. R.; Kantz, W. y Leedle, J. A. S. (2003).** Effects of bacterial direct- fed microbials and yeast on site and extent of digestion blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feed lot cattle. J. Anim. Sci. 81:1628-1640.

6. **Beauchemin, K.A.; Yang, W.Z.** (2005) Effects of physically effective fiber an intake, chewing activity and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. *J. Dairy Sci.*, 88:2117-2129.
7. **Beuvink, J. M. W.; Spoelstra, S. F.** (1992) Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 505-509.
8. **Blaut, M.** (2002) Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr* 41 [Suppl 1]: I/11–I/16.
9. **Brown, V. E.; Rymer, C.; Agnew, R. E y Givens, D. I** (2002). Relationship between *in vitro* gas production profiles of forages an *in vivo* rumen fermentation patterns in beef steers fed those forages. *Anim. Fedd Sci and Tech.* 98:13-24.
10. **Callaway. T; Martin. S.** (1996). Efects of organic acid and monensin treatment on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation of cracked. *J. Anim. Sci.* 74:1982-1989.
11. **Callaway, R.; Anderson, R.C.; Edrington, T.S.; Genovese, K.J.; Bischoff, K.M.; Poole, T.L.; Jung, Y.S.; Harvey, R.B.; Nisbet, D.J.** (2004) What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *J Anim Sci* 2004 82: E93-99E.
12. **Calsamiglia, S.; Ferret, A.** (2002). XVIII Curso de Especializacion FEDNA, Barcelona, P. 97-115.
13. **Chenost, M.; Aufrere, J.; Macheboeuf, D.** 2001. The gas-test technique as a tool for predicting the energetic value of forage plants. *Anim. Res.* 50, 349-364.
14. **Collins, M D.; Gibson, G.R.** (1999) Probiotics, prebiotics, and symbiotic: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr*, 69(suppl):1052S-1057S.
15. **Cone, J. W.,** (1998). The development, use and application of the gas production technique as the DLO Institute for Animal Science and Health (ID-DLO). *In vitro* Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants. BSAS, Edinburgh, UK, 65-78 BSAS Occ. Publ. No.22.
16. **Czerkawski, J. W.; Breckenridge, G.,** (1975). New inhibitors of methane production by rumen micro-organisms. Development and testing of inhibitors *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 34: 429-444.
17. **Davies, Z. S.; Mason, D.; Broocks, A. E.; Griffth, G. W.; Merry, R. J.; Theodorou, M. K.** (2000). An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grauss silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 38:205-221.

18. **De Vrese, M.; Stegelmann, A.; Richeter, B.; Fenselau, S.; Laue, C. y Schenzenmeir, J.** (2001). Probiotics compensation for lactase insufficiency. *Anim. J. Clin. Nutr. (suppl.1)*, 421S-429S.
19. **Downer, J. V.; Cummings, K. R.** (1985). A ten year review of lactation study. *J. Dairy Science* 68 (Suppl. 1): 191-201.
20. **Dulphy, J. P.; Demarquilly, C** (1972) Influence de la finesse de hachage des ensilages de graminées sur le comportement alimentaire des moutons. *Ann. Zootech.* 21:443-449.
21. **Duncan, S.H.; Scott, K.P.; Ramsay, A.G.; Harmsen, H.J.M.; Welling, G.W.; Stewart, C.S. & Flint, H.J.** (2003) Effects of Alternative Dietary Substrates on Competition between Human Colonic Bacteria in an Anaerobic Fermentor System. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1136-1142.
22. **Ellegard, L.; Anderson, H.; y Basaeus, I.,** (1997). Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, an the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Fe, Zn, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51:1-5.
23. **Enemark, J.M.D** (2008) the monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *Vet. J.* 176: 32-43.
24. **Erdmar, R.** (1988). Forage pH effects on intake in early lactation dairy cows. *J Dairy Sci* 712:1198-1203.
25. **Garner, M.R.; Gronquist, M.R.; Russel, J.B.** (2004) Nutritional requirements of *Allisonella histaminiformans*, a ruminal bacterium that decarboxylates histidine and produces histamine. *Curr. Microbiol.*, 49(4):295-299.
26. **Garry, F. B.** (2002). Indigestion in ruminants. In: Smith, B. P. (ed.), *Large Animal Internal Medicine*, 3rd edn. 722-747.
27. **Gibson. G. R; Roberfroid . M. B** (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota. : introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1412.
28. **Ghorbani. G.R , Morgavi D.P; Beauchemin, K.A.; Leedle, J.A.Z** (2002) Effect of bacterial direct- fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 80:1977-1986.
29. **Gozho, G.N.; Plaizier, J.C.; Krause, D.O.; Kennedy, A.D.; Wittenberg, K.M.** (2005) Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.*, 88:1399-1403.
30. **Hungate, R. E.,** *The rumen and its Microbes*, academic Press, London and New Yorck, 1996.

31. **Hungtinton, G.B; Prior, R.L; Briton, R.A** (1981). Glucose and Lactate absorption and metabolic. Interrelationship in steers changed from low to high concentrate diets. *J. Nutr.* 111:1164-1172.
32. **Hutjens, M. F.** (1991). Feed additives. *Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice.* 7:525-540.
33. **Jaurena, G,** 19998. Efecto de la acidez de los silajes sobre la produccion de gas *in vitro*. Congreso Argentino de Producción Anim. Asociacion Argentina de Peoduccion Animal. 22:98-90.
34. **Jouany, J. P.; Thivend, P.** (1986). In vitro effects of avoparcin on protein degradability and rumen fermentation. *Anim. Feed Sci Technol.* 15:215-229.
35. **Jouany, J. P.; Ushida, K.,** (1998). The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Aus. J. Anim. Sci* 12:113-128.
36. **Keunen, J. E.; Plaizier, J. C.; Kyriazakis, L.; Duffield, T. F.; Widowski, T. M.; Lindinger, M. I.; McBride, B. W.** (2002) Effects of a Subacute Ruminal Acidosis Model on the Diet Selection of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 85:3304-3313.
37. **Kleen, J. L.; Hooijer, G. A.; Rehage, J. & Noordhuizen, J. P. T. M.** (2003) Subacute Ruminal Acidosis (SARA): a Review. *J. Vet. Med. A* 50, 406-414.
38. **Krause, K., & Oetzel, G.** (2005). Inducing sub acute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *J. Dairy Science,* 88(10): 3633-3639.
39. **Krause, K., & Oetzel, G.** (2006). Understanding and preventin g subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol,* 126(3/4): 215-236.
40. **Krause, K., Dhuyvetter, D., & Oetzel, G.** (2009). Effect of a low-moisture buffer block on ruminal pH in lactating dairy cattle induced with subacute ruminal acidosis. *J. Dairy Science,* 92(1): 352-364.
41. **Lipke P. N; Ovalle , R;** (1998). Cell Wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *J bact.* 180: 3735-3740.
42. **Liong, M.T.; Shah, N.P.** (2005a) Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. *J. App. Microbiol.,* 99:783-793.
43. **Liong, M.T.; Shah, N.P.** (2005b) Optimization of cholesterol removal, growth and fermentation patterns of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 in the presence of mannitol, fructo-oligosaccharide and inulin: a response surface methodology approach. *J. App. Microbiol.,* 98:1115-1126.
44. **Lister, C. J.** (1984) Effects of inntraruminal administration of polyol to sheep. *J. Sci. Food Agric.* 35:21-28.

45. **Marteau, P.; Seksik, P.** (2004) Tolerance of Probiotics and Prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 38(6 Suppl): S67-S69.
46. **Mauricio, R. M.; Mould, F. L.; Dhanoa, M. S.; Owen, E.; Channa, K. S.; Theodorou, M. K.** (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci Technol* 79:321-330.
47. **Mc Bee, R. H.** (1952) Manometric method for the evaluation of microbial activity of rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Appl Microbiol* 1:106-110.
48. **McCarthy, K. C.; Rastall R.A.** (2003) Sticking your' ose in it: Prebiotics. *Biologist* 50: 259-262.
49. **Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A.,Steingass, H.,Fritz., D.,Schneider, W.** (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. Camb.* 93:217-222.
50. **Menke, K.H., Steingas, H.** (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7-55.
51. **Mould, F. L.; Mauricio, R. M.; Smith, T. y Owen, 2000.** The influence of rumen fluid pH on the rate and extent of maize Silage and wheat straw degradation estimated *in vitro* using the Reading Pressure Technique. *Proceeding of the British Society of Anim. Sci.* 53:31-44.
52. **Nagaraja, T. G. & Titgemeyer, E. C.** (2006) Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. *J. Dairy Sci.* 90 (E. Suppl.):E17-E38.
53. **Newbold, C. J.; Lassalas, B.; Jouany, J. P.** The importance of metanogenesis associate with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*, *let. Appl: Microbiol.* 21(1995): 230-234.
54. **Nisbet, D.J; Martin, S. A.** (1990) Effect of Dicarboxylic Acids and *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract on Lactate Uptake by the Ruminal Bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3515-3518.
55. **Nocek, J.** (1997) Bovine Acidosis: Implications on Laminitis. *J. Dairy. Sci.,* 80:1005-1028.
56. **Osborne, J. M., Deority, B. A.** (1989). Synergism degradation and utilization of Intact forage Cellulose, Hemicellulose, and Pectin by Three Pure Cultures of Ruminal Bacteria. *Appl environ microbiol* 1989; 55:2247-2250.
57. **O'Grady, L., Doherty, M., & Mulligan, F.** (2008). Subacute ruminal acidosis (SARA) in grazing Irish dairy cows. *Vet. J.* 176(1): 44-49.
58. **Pell, A. N.; Schofield, P.** (1993). Computerised monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci* 76:1063-1073.
59. **Rabiu, B. A; Jay, A. T; Gibson, G. R; Rastall, R. A.** Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosacharides by β -

- galactosidases from bifidobacterium species. *Appl Environ microbiol* 2001; 67:2526-30.
60. **Roberfroid, M.** (2001). Prebiotics: Preferential substrate for specific germs. *American Journal of Clinical Nutr.* 73(2suppl.): 406-409.
61. **Roos, J. M; Katan, M. B. (2000).** Effects of probiotics bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:405-411.
62. **Rusell, J. B.; Chow, J. M.** (1993). Another theory for the action of ruminal buffer salts: decreased starch fermentation and propionate production. *J. Dairy Sci.* 76:826-830.
63. **Rymer, C.; Huntington, J.A.; Williams, B.A.; Givens, D.I.** (2005) *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 9-30.
64. **Sauvant, D.; Meschy, F.; Mertens, D.** (1999) Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Prod. Anim.*, 12:49-60.
65. **Sauvant, D.; Giger-Reverdin, S.; Meschy, F.** (2006) Le contrôle de l'acidose ruminale latente. *INRA Prod. Anim.*, 19:69-78.
66. **Schofield, P.; Pitt, R. E.; Penn, A. N.,** (1994). Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Anim. Sci.* 72:2980-2991.
67. **Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994.** A simple gas production method to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185-197.
68. **Trei, J.; Hale, W.; Theurer, B.** (1970). Effect of grain processing on *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.* 30:825-831.
69. **Tuohy, K.M.; Rouzaud, G.C.M.; Brück, W.M.; Gibson, G.R.** (2005) Modulation of the Human Gut Microflora Towards Improved Health Using Prebiotics - Assessment of Efficacy. *Current Pharmaceutical Design*, 11:75-90.
70. **Tung, R.S. & Kung, L.** (1993) *In vitro* effects of a thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 76:1083-1090.
71. **Van Loo, A.** How chicory fructans contribute to zootechnical performance and well. Being in *Livestock and companion animals*, (2007). *J Nutr.* 137: 2594. S – 25 97 S.
72. **Van Soest, P. J.,** Nutritional ecology of the ruminant, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1994.

73. **Wang, X.; Gibson, G.R.** effects of the *in vitro* fermentation on oligofructosa and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 1993. 75:373-80.
74. **Weimer, P.J.** (1998) Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.*, 76:3114-3122.
75. **Wilkins, J.**, (1974). Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Appl. Microbiol.* 27:135-140.
76. **Williams, B.A., Bosch M.W., Boer H., Verstegen M.W.A. & Tamminga S.** (2005) An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 445-462.
77. **Yang, W. Z.; Beauchemin, K. A.** (2006) Effects of Physically Effective Fiber on Chewing Activity and Ruminal pH of Dairy Cows Fed Diets Based on Barley Silage. *J. Sci.* 89:217-228.