

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE SUSTANCIAS CON POTENCIAL PARA PREVENIR LA
ACIDOSIS RUMINAL: TÉCNICA DE FERMENTADORES *IN VITRO***

Por

**Sabrina ALEGRE BARRETO
María Emilia REMUÑAN ARMANETTI
Lucía SARRALDE REBOLLO**

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

MODALIDAD

ENSAYO EXPERIMENTAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

Página de aprobación

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Pablo Zunino

Segundo miembro (Tutor):

Ariel Aldrovandi

Tercer miembro:

Islamey Tebot

Fecha:

29 de octubre de 2013

Autores:

Sabrina Alegre Barreto

María Emilia Remuñan Armanetti

Lucía Sarralde Rebollo

Tabla de contenido

Página de aprobación.....	ii
Lista de cuadros y figuras.....	iv
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
Acidosis ruminal.....	4
Fisiología ruminal.....	4
Acidosis.....	6
Alimentos funcionales.....	9
Probióticos.....	9
Prebióticos.....	11
Simbióticos.....	14
Técnicas de producción de gas.....	15
Agentes reductores.....	16
pH.....	16
Inóculo.....	17
Producción de gas.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Sistema de fermentación.....	19
Diseño experimental.....	20
Desarrollo del experimento.....	20
Mediciones realizadas.....	20
Producción de gas.....	20
Medida de pH.....	20
Análisis estadístico.....	20
RESULTADOS.....	21
Medida de pH.....	21
Producción de gas.....	27

DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

Lista de cuadros y figuras

Figura 1. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inactivada en tres dosis.....	22
Figura 2. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de inulina en tres dosis.....	23
Figura 3. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de sorbitol en tres dosis.....	24
Figura 4. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de ácido málico en tres dosis.....	25
Figura 5. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de malato de sodio en tres dosis.....	26
Figura 6. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inactivada en tres dosis.....	29
Figura 7. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de inulina en tres dosis.....	30
Figura 8. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de sorbitol en tres dosis.....	30
Figura 9. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de ácido málico en tres dosis.....	31
Figura 10. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de malato de sodio en tres dosis.....	31
Figura 11. Comparación de la producción acumulada de gas y el pH de los tratamientos de malato de sodio al 9 y 15%.....	32

Tabla 1. Localización y funciones de los microorganismos ruminales (Tebot, I., 2008).	4
Tabla 2. Características del retículo-rumen como cámara de fermentación (Tebot, I., 2008).	5
Tabla 3. Saliva artificial (solución tampón). Según Aldrovandi y col., 2009. (Contenido para 1 L).	19
Tabla 4. Análisis de los datos de pH en cada tiempo de apertura. Los datos corresponden a los valores medios para cada tratamiento en cada tiempo.....	21
Tabla 5. Datos de producción de gas acumulado (mL/g). Los datos corresponden a los valores medios para cada tratamiento en cada tiempo.....	28

RESUMEN

La acidosis subclínica es una patología que adquiere gran importancia en los sistemas de producción intensivos, tanto lechero como engorde a corral, causando descenso en la producción de leche, depresión de la grasa láctea, pérdidas de la condición corporal, entre otras, llevando así a grandes pérdidas económicas.

Durante muchos años se han utilizado antimicrobianos en el alimento a niveles subterapéuticos para contrarrestar dichas pérdidas, los cuales dejan residuos en los productos de origen animal ocasionando fenómenos de resistencia microbiana lo que constituye un factor de virulencia para una eventual infección en humanos y animales.

Por estas razones se han buscado alternativas al uso de antibióticos incluyendo el uso de prebióticos, probióticos y su combinación.

En este trabajo se evaluó el posible efecto prebiótico de cinco sustancias (cultivos inactivados de *Saccharomyces cerevisiae*, inulina, sorbitol, ácido málico y malato de sodio) en un ensayo *in vitro* de 24 horas determinando los valores de pH y producción de gas.

Todas las sustancias presentaron algún efecto modulador del pH, ya sea en mayor o menor medida. Los tratamientos de malato de sodio a las dosis de 15 y 9% fueron los que mejor desempeño tuvieron. Otros tratamientos que se destacaron fueron los de *Saccharomyces cerevisiae* inactivado a las dosis de 15 y 9%. Los efectos amortiguadores sobre el pH se consolidaron en los tiempos de 12 y 24 horas.

Los tratamientos correspondientes al ácido málico presentaron valores de pH por debajo del control, en contraste con los resultados de estudios de algunos autores.

La producción de gas no resultó útil para la evaluación de los distintos tratamientos, debido a que no permitió discriminar entre los que efectivamente amortiguaron el descenso de pH y los que no lo hicieron.

SUMMARY

Subacute ruminal acidosis is a significant illness for both milk and meat intensive production systems causing a decrease in milk production, milk fat and loss of body condition among others, leading to economic losses.

For many years, antibiotics have been used at subtherapeutic levels in cattle meals in order to reduce such losses, leaving residues in animal products causing microbial resistance phenomena which constitute a virulence factor for an eventual infection in human beings and animals.

For these reasons, different alternatives to antibiotic use have been investigated including prebiotics, probiotics and their combinations.

In this essay, it has been evaluated the possible probiotic effect of 5 substances (inactivated cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, inulin, sorbitol, malic acid, and sodium maleate) in a 24 hour *in vitro* experiment measuring pH values and gas production.

All such substances had some modulating effects on pH in different ways. Sodium maleate treatments at a 15% or 9% dose were the ones with better effect. Another effective treatment was inactivated *Saccharomyces cerevisiae* at a dose of 15% and 9%. The modulating effects occurred in a 12 and 24 hour time. Malic acid treatments had a pH range lower than control sample in contrast with studies made by other authors.

Gas production was not found useful for the evaluation of the different treatments as it could not make it possible to discriminate between those which effectively buffered the decrease of pH levels and those which did not.

INTRODUCCIÓN

La acidosis ruminal, es un padecimiento de los rumiantes que cursa, según el grado de gravedad, con cambios en el pH ruminal lo que trae aparejado consecuencias microbiológicas y metabólicas que impiden el aprovechamiento de los alimentos. Dentro de los trastornos digestivos se pueden incluir disminución de la motilidad ruminal, estasis ruminal, heces blandas, ruminitis e hiperqueratosis (Nocek, 1997; Keunen y col., 2002). También y a consecuencia de estos cambios puede haber otras repercusiones por la producción de toxinas y sustancias vasoactivas que pasan al torrente sanguíneo y realizan su efecto negativo a distancia como abscesos hepáticos y laminitis (Nocek, 1997; Gozho y col., 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; Garner y col., 2004; Beauchemin y Yang, 2005). Todo ello puede deberse a las características químicas de la dieta y al estado físico de los alimentos que la componen. Los carbohidratos de fácil digestión (azúcares solubles y almidón) son fermentados más rápidamente que los carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa). Esto conduce a una síntesis más rápida de AGV acompañada por una baja producción de saliva, disminuyendo así el pH ruminal. La forma física de los alimentos es importante para inducir una adecuada rumia. El forraje fibroso estimula mucho a la rumia mientras que los concentrados prácticamente no lo hacen. Durante la rumia se secreta gran cantidad de saliva que llega al rumen con la deglución, la cual contiene bicarbonato y fosfato que le dan un pH alcalino (8.2 a 8.4) y que en el rumen actúan como tampón frente a la producción de ácidos. Cuando el rumiante consume concentrados la rumia disminuye y por lo tanto se reduce la producción de saliva, con la consecuente disminución del pH ruminal (Church, 1993; Krehbiel y col., 1995; Nocek, 1997; Bach, 2002).

Con el objetivo de aumentar la productividad del ganado se ofrece a los animales una dieta con alto contenido energético y con un menor tamaño de partícula. Esto produce una disminución del pH debido a dos fenómenos: mayor producción de ácidos orgánicos por una fracción muy activa de la biota y menor número de masticaciones con menor tamponamiento por baja secreción de saliva (Sauvant y col., 1999; Calsamiglia y Ferret, 2002; Beauchemin y Yang, 2005; Sauvant y col., 2006; Yang y Beauchemin, 2006; Krause y Oetzel, 2006; Bramley y col., 2006; Nagaraja y Lechtenberg, 2007). Estos hechos se constatan en animales de alta producción, tanto en tambos como en sistemas intensivos de engorde a corral (Krehbiel y col., 1995; Bach, 2002).

Desde hace algunos años, en nuestro país se ha incrementado la producción en los rubros agropecuarios. En la actualidad, la alimentación se ha tornado un factor fundamental debido al crecimiento de la modalidad de producción de engorde a corral, el incremento sostenido que viene teniendo la producción láctea y la apertura

de mercados para carne de alta calidad (cuota 481/UE). Dicha alimentación busca maximizar el aporte energético y el incremento del consumo diario, de manera que los animales están sometidos a condiciones que los llevan a padecer una serie de enfermedades subclínicas cuyo impacto es principalmente económico (Antúnez, 2012; Instituto Nacional de Carnes, 2012; MGAP-DIEA, 2013).

Para poder incrementar la producción minimizando las pérdidas económicas producidas por éstas enfermedades subclínicas se han seguido diferentes estrategias que conducen a la modulación de la biota ruminal. Esto incluye inhibidores (iodados, extractos con aceites esenciales), probióticos, prebióticos y sus combinaciones.

Los antimicrobianos se han utilizado como moduladores del desarrollo microbiano excesivo, en forma relativamente exitosa, aunque con el inconveniente que su efecto inhibitorio no es muy específico y dejan residuos en los productos animales favoreciendo el desarrollo de resistencia bacteriana. (Erickson y col., 2003; McGinn y col., 2004)

Recientemente han surgido múltiples estudios buscando alternativas más naturales que buscan extraer de diversas fuentes de origen vegetal comestibles (especies como por ejemplo, extracto de ajo, orégano, clavo, pimiento y canela) principios activos relativamente inocuos, pero que podrían modular la micropoblación produciendo inhibición selectiva de grupos microbianos (Calsamiglia y col., 2005; Benchaar y col., 2007).

Los probióticos son suplementos alimentarios conformados por microorganismos vivos que afectan benéficamente al animal huésped mejorando su balance microbiano intestinal (Collins y Gibson, 1999).

Los prebióticos son compuestos orgánicos no digeribles por el huésped al que se le administran, los cuales son utilizados por un grupo más o menos específico de microorganismos, obteniendo el animal que la alberga, a través de ello, un efecto positivo como prevención de trastornos digestivos, mejora de la producción animal, etc. (Marteau y Seksik, 2004; Liong y Shah, 2005 a y b; Tuohy y col., 2005). Los prebióticos presentan la ventaja de ser fácilmente administrables y no requerir condiciones particulares de conservación (Callaway y col., 2004).

Las estrategias combinadas en general pueden resultar más efectivas, no obstante requieren que previamente se conozca los efectos de cada componente y por lo menos de algunas interacciones entre ellos. Son los denominados simbióticos y consisten en una mezcla de probióticos y de prebióticos.

El ambiente ruminal puede ser estudiado a través de varios métodos experimentales, como ser técnicas *in vivo*, *in vitro* e *in situ*. En los métodos *in vivo* se trabaja directamente con animales, pero hay que disponer de más tiempo y espacio, por lo que es una técnica costosa y laboriosa. La técnica *in vitro* es más sencilla y menos costosa, pero simula la realidad de una manera limitada debido a que no se ejerce control sobre aspectos importantes que definen las condiciones fisiológicas

digestivas de los rumiantes (Carro y col., 2005; Giraldo y col., 2007; Fondevila y Pérez-Espes, 2008).

Las técnicas de fermentación con medición del gas acumulado *in vitro*, fueron desarrolladas para estudiar la capacidad digestiva del rumen, pudiendo realizar además de este estudio otros como la cinética de fermentación, grado de digestibilidad de los alimentos y evaluación del pH (Martin y Nisbet, 1990; Nisbet y Martin, 1991; Callaway y Martin, 1996; Martin, 1998).

El objetivo de todos los sistemas de fermentación *in vitro* consiste en crear un entorno que simule una sección específica del tracto gastro-intestinal. En la actualidad hay relativamente pocos trabajos *in vitro* que reproduzcan la acidosis ruminal con un seguimiento de la dinámica de descenso del pH desde el inicio del experimento. Aldrovandi y col., 2009, simularon acidosis ruminal en un ensayo *in vitro* colocando un sustrato acidogénico con varias mediciones del pH a lo largo de 24 horas. En cambio hay experimentos que desde el inicio de los mismos presentan un pH inferior al fisiológico debido a la adición de ácidos (cítrico, sulfúrico, clorhídrico o fosfórico) cuyo objetivo fue estudiar la capacidad de la biota ruminal de digerir diferentes sustratos en condiciones de estrés (Colombatto y col., 2007; Kozloski y col., 2007)

La técnica de producción de gas *in vitro* se utiliza cada vez más para predecir la digestión fermentativa de los alimentos y el comportamiento de los microorganismos ruminales (Chenost, 2001).

Para realizar el siguiente trabajo se optó por el uso de fermentadores *in vitro* estático, tomando como variable de respuesta principal el pH y secundaria la producción de gas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Acidosis ruminal

Fisiología ruminal

El rumen es un órgano muy complejo donde encontramos una serie de diferentes microorganismos, como bacterias, protozoarios y hongos (Tabla 1). Estos microorganismos son, en gran medida, responsables de los procesos fermentativos de los diferentes alimentos. Los animales no poseen enzimas propias del organismo que puedan digerir celulosa ni hemicelulosa. Estos carbohidratos sólo pueden ser digeridos con la ayuda de enzimas de origen microbiano, y éste es el fundamento de la simbiosis entre el rumiante y los microorganismos del rumen. De esta manera se convierten materiales no aprovechables en nutrientes absorbibles, como por ejemplo AGV y proteína microbiana (Smith, 2008).

Tabla 1. Localización y funciones de los microorganismos ruminales (Tebot, I., 2008).

TIPO	LOCALIZACIÓN	FUNCIONES
Bacterias	Libres: LAB	<ul style="list-style-type: none"> Degradan gran variedad de sustratos libres Síntesis de vitaminas
	Adheridas a partículas alimentarias: SAB	<ul style="list-style-type: none"> Degradan celulosa y almidón Proteólisis Síntesis de vitaminas
	Fijas a las paredes ruminales: flora epimural	<ul style="list-style-type: none"> Ureólisis Proteólisis parietal Captación de O₂
Protozoarios	Libres (transitoriamente fijos)	<ul style="list-style-type: none"> Proteólisis Stock de glúcidos Fagocitosis de bacterias Desagregación mecánica
Hongos y levaduras	Adheridos a partículas alimentarias	<ul style="list-style-type: none"> Degradan glúcidos y proteínas Desagregación mecánica Síntesis de vitaminas
Bacteriófagos	Intrabacterianos	<ul style="list-style-type: none"> Lisis bacteriana

Los AGV son unos de los productos finales de la digestión y son absorbidos desde el rumen para ser utilizados como nutrientes para el mantenimiento, crecimiento y producción (Hagg, 2007; Smith, 2008). El principal AGV es el acetato que representa el 55-70% de la producción, es utilizado como fuente de energía para el rumiante y como precursor de la síntesis de ácidos grasos cortos y medianos que componen las grasas de la leche. Éste se genera principalmente por la digestión de la fibra. El propionato es producido por la digestión bacteriana de hidratos de carbono de fácil digestión, entre otros, los almidones y representa el 15-30% de la producción. El propionato es convertido a glucosa en el hígado y es por lo tanto precursor de la

lactosa de la leche. Por último se encuentra el butirato que constituye el 5-15%, es cetogénico, aporta energía a los músculos y es precursor de las grasas lácteas (Smith, 2008; Tebot, I., 2008).

El retículo-rumen es considerado como una gran cámara de fermentación. En la Tabla 2 se detallan las propiedades de este órgano complejo y como se logra el mantenimiento de las mismas.

Tabla 2. Características del retículo-rumen como cámara de fermentación (Tebot, I., 2008).

Propiedades	Mantenimiento / Regulación
1. Medio líquido (agua libre = 90%)	<ul style="list-style-type: none"> • Bebida • Salivación • Alimentos { Bov= 100-150 L/24 h Ov= 10-15 L/24 h
2. Temperatura constante (39 – 41 °C)	Metabolismo corporal + fermentación ruminal
3. Anaerobiosis casi completa	Flora epimural anaeróbica facultativa
4. pH regulado	HCO_3 y HPO_4 saliva } { Ac. Láctico Amoniac } { AGV y CO_2
5. Entrada continua (sustratos y m.o.)	Ingestión de tipo continuo + rumia
6. Eliminación continua de los productos de la fermentación	<ul style="list-style-type: none"> • Absorción (AGV, NH_3) • Eructación (CO_2 y CH_4) • Tránsito (alimento y m.o.) } + cadenas simbióticas
7. Mezcla continua y tránsito lento	Motilidad general de los pre-estómagos

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 más susceptible a variación y la alimentación 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. Mientras que las fermentaciones de hidratos de carbono no estructurales son energéticamente más eficientes, son altamente acidogénicas y su cantidad debe limitarse y/o contrarrestarse con hidratos de carbono fibrosos, ya que éstos aportan capacidad tamponante al medio ruminal al estimular la rumia aumentando la secreción de saliva (Calsamiglia y Ferret, 2002).

Los ácidos orgánicos son producto de la fermentación microbiana de los alimentos. En una situación normal, los ácidos orgánicos no se acumulan en el rumen debido a que son absorbidos continuamente. Las concentraciones de los AGV en el rumen representan el equilibrio entre tasa de producción y su absorción. En tal situación, la fermentación ruminal es estable y el pH ruminal puede variar desde 5,6 hasta 6,5, con un pH promedio alrededor de 5,8 a 6,2. El pH puede caer por debajo de 5,6

durante un breve período durante el ciclo de alimentación normal. La fluctuación se produce porque el pH ruminal está influenciado por la ingesta de granos, la capacidad inherente del animal para proporcionar amortiguación y las tasas de uso y absorción de AGV (Church, 1993; Krause y col., 2006; Nagaraja y Lechtenberg, 2007).

Acidosis

La acidosis ruminal es un trastorno nutricional de los rumiantes producido, en general, como resultado del consumo de alimentos ricos en carbohidratos fácilmente fermentescibles, especialmente cuando los animales no están previamente condicionados a estos alimentos, causando una acumulación no fisiológica de ácidos orgánicos en el rumen, con una reducción concomitante del pH (Krause y col, 2006; Bramley y col., 2006; Nagaraja y Lechtenberg, 2007).

Otros autores indican la existencia de factores adicionales que resultan igualmente importantes, por lo que consideran que la acidosis podría deberse además a la incapacidad de mantener la actividad efectiva del buffer en el rumen o eliminación de subproductos de fermentación después del desafío con sustratos rápidamente fermentescibles (Bramley y col., 2006).

No hay unanimidad en la bibliografía con respecto al valor de pH que indique una acidosis. El valor de pH que se considera límite siempre ha sido asignado arbitrariamente por diferentes autores en referencia a sus condiciones de trabajo. Así mismo es importante el momento en que se toma la muestra. Nagaraja y Titgemeyert (2007) fijaron un pH ruminal de 5,6 o inferior como punto de referencia para el establecimiento de acidosis ruminal, un rango de pH de 5,0 a 5,6 fue considerado como la acidosis subaguda o crónica y un pH por debajo de 5,0, acercándose a 4,5 o inferior, fue considerado acidosis aguda. Krehbiel y col. (1995) establecieron un umbral de pH de 6,0 para la acidosis subclínica. Schwartzkopf-Genswein y col. (2003) y Beauchemin y col. (2003) plantearon que la medición de pH debía realizarse al menos durante 12 horas y propusieron el valor límite de 5,8 en estas condiciones. Gozho y col. (2005) establecieron un rango de pH de entre 5,2 y 5,6 por lo menos durante 3 horas por día. Garrett y col. (1999) establecieron la acidosis ruminal subaguda como periodos mantenidos de pH de 5 a 5,5.

Esta patología suele ir acompañada de una alta concentración de AGV y como signo patognomónico un bajo pH ruminal. Los AGV son absorbidos a través de la pared ruminal por difusión pasiva, y por lo tanto, a mayor gradiente de concentración entre el líquido ruminal y la sangre, mayor velocidad de absorción. Además esta difusión pasiva es más eficaz cuando el AGV está en forma no disociada (carga neutra) que en forma disociada (carga ácida) (Bach, 2002).

La acidosis clínica se denomina frecuentemente acidosis láctica, ya que está asociada con un gran aumento de ácido láctico en el rumen. Aunque son numerosas las bacterias que sintetizan ácido láctico, *Streptococcus bovis* es la más importante. La mayor parte de este ácido láctico producido es metabolizado en el rumen, siendo

Megasphaera elsdenii la especie que más contribuye a este proceso. Por lo general el desarrollo de acidosis es debida mayoritariamente a la no metabolización del ácido láctico que al incremento de su síntesis. El síndrome suele iniciarse cuando se ingieren dietas con alto contenido de hidratos de carbono fácilmente fermentescibles o forrajes con bajo contenido de fibra efectiva, o ambas cosas, lo cual produce un aumento de grupos bacterianos productores de ácido láctico (*S. bovis*). El desarrollo lento de las bacterias utilizadoras de ácido láctico favorece su acumulación. Cuando el ácido láctico se acumula y el pH disminuye por debajo de 5,5 las poblaciones mayoritarias utilizadoras de ácido láctico y la población productora de ácido láctico desaparecen y son sustituidas por lactobacilos productores de ácido láctico. La acumulación de ácido láctico reduce más el pH, entrando en un círculo vicioso que conduce a la acidosis metabólica y a la aparición de síntomas clínicos (Nocek, 1997; Calsamiglia y Ferret, 2002).

Los síntomas generales de acidosis aguda incluyen fuerte descenso o interrupción del consumo de alimentos (anorexia), estasis ruminal, ruminitis, heces sueltas o diarrea, un aspecto apático, deprimido o de agotamiento, deshidratación, infosura o dolor en las pezuñas y muerte. Los animales que se recuperan después de un episodio de acidosis ruminal sostenida pueden desarrollar abscesos hepáticos, ruminitis con hiperparaqueratosis de las papilas, laminitis y poliencefalomalacia. Estos problemas se verán reflejados en una disminución del rendimiento (consumo de alimento y ganancia de peso) (Church, 1993; Krehbiel y col., 1995; Nagaraja, Lechtenberg, 2007; Hagg, 2007).

La acidosis ruminal no debe ser definida solamente como un bajo pH ruminal, sino que debe ser descrita como un síndrome relacionado con un trastorno de fermentación del rumen (Hagg, 2007).

La acidosis subclínica es consecuencia de períodos transitorios repetidos de pH ruminal moderadamente bajos que no son suficientes para desencadenar la sintomatología clínica de acidosis. La suplementación de raciones altamente fermentescibles estimula el desarrollo de la mucosa ruminal que inicialmente favorece la absorción de los AGV. Sin embargo, en mucosas no adaptadas, la absorción de AGV es lenta y su acumulación provoca una ligera acidosis ruminal. 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 (Calsamiglia y Ferret, 2002).

Sauvant y col. (2006) consideraron la acidosis latente o subclínica como un fenómeno complejo que ocurre en situaciones en las que el pH ruminal reside por largos períodos durante el día entre los valores de 5,5 y 6,2. Esta es una situación común para los animales de alta producción que reciben raciones con alto contenido

de concentrado con el fin de satisfacer sus necesidades energéticas. Durante la acidosis subclínica el perfil de AGV del fluido ruminal cambia, con bajos valores en la relación acetato/propionato resultando en un cambio del metabolismo con una caída del contenido de la grasa de la leche.

Detectar una acidosis subaguda clínicamente no es tan simple como detectar la acidosis ruminal aguda. Los únicos síntomas que normalmente son evidenciados son disminución y/o consumo errático de alimentos. Algunos otros signos que pueden evidenciarse son disminución de la producción de leche, jadeo, ptialismo, pateo del flanco, pica y diarrea (Hagg, 2007). Mientras que la acidosis aguda es fácil de detectar y si se diagnostica de forma temprana, puede ser tratada, la acidosis subaguda es probablemente la forma más prevalente y más difícil de detectar y diagnosticar (Henning, 2007).

La acidosis subclínica cobra mucha importancia debido a las grandes pérdidas económicas que genera, principalmente por descenso en la producción de leche, depresión de la grasa láctea y pérdida de la condición corporal. Ésta puede tener un efecto negativo significativamente notable en la producción y los aspectos financieros de cualquier producción intensiva, tanto lechera como engorde a corral (Krehbiel y col., 1995; Nocek, 1997; Bach, 2002).

A pesar de las consecuencias negativas que una acidosis ruminal puede conllevar, los nutricionistas insisten 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 presentan 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, 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 protozoarios del rumen disminuye (los protozoarios ingieren una gran cantidad de bacterias) y 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. Por otro lado, 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).

El objetivo de los nutricionistas, al aplicar los programas de alimentación de dietas ricas en concentrados es maximizar el rendimiento y la eficiencia, manteniendo los

trastornos digestivos tales como la acidosis ruminal dentro de límites aceptables a través de un buen manejo nutricional. Los modernos sistemas de producción intensiva, especialmente en vacas de alta producción, involucran la alimentación de altos niveles de concentrados con el fin de suministrar nutrientes suficientes para mantener un alto nivel de producción de leche. La alimentación con estos altos niveles de concentrado a menudo conduce a la disfunción metabólica y la acidosis ruminal, especialmente bajo condiciones de métodos deficientes de alimentación y/o composición de las dietas (Hagg y col., 2010).

Alimentos funcionales

El término alimento funcional se utiliza para describir alimentos que contienen nutrientes cuya ingesta provoca importantes efectos sobre los procesos fisiológicos que es independiente de su función nutritiva establecida (Duggan y col., 2002).

En los sistemas de producción intensiva se ha agregado sistemáticamente antimicrobianos en el alimento a niveles subterapéuticos, ya que proporcionan protección contra ciertas enfermedades, y al mismo tiempo actúan como promotores del crecimiento al eliminar microorganismos no deseados que se encuentran en el tubo digestivo. Sin embargo, el problema de usar antibióticos en dietas para animales radica en que quedan residuos de esas sustancias en los productos animales (carne, leche, huevo). Éstos al ser consumidos por el hombre en cantidades subletales, pueden producir resistencia de los microorganismos patógenos a la acción de esos antibióticos y, por consiguiente, el humano se encontraría en condiciones más precarias de defensa, especialmente contra bacterias (Castro y Rodríguez, 2005; Figueroa y col., 2006).

Debido a ello se han implementado diversas estrategias para mejorar la producción sin el uso de antibióticos, siendo importantes aquellas sustancias que actúan en la modulación de la biota en porciones específicas del tubo digestivo. Entre estas estrategias estaría el uso de inhibidores no antibióticos, microorganismos promotores de la salud y sustancias que estimulan selectivamente grupos de microorganismos y la combinación de estos dos últimos (Gibson y Roberfroid, 1995; Collins y Gibson, 1999; Calsamiglia y col, 2005; Figueroa y col., 2006).

Probióticos

Los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que, cuando se ingieren, ejercen una influencia positiva en la salud del huésped o la fisiología, mejorando el equilibrio microbiano intestinal (Marteau y col., 2004). Los microorganismos involucrados son por lo general lactobacilos, bifidobacterias y levaduras. Este concepto está asociado a la consideración del humano como único huésped. Al extender el concepto a las especies de animales domésticos, incluyendo los rumiantes, los grupos microbianos blanco pueden diferir sustancialmente.

Un probiótico eficaz debe: 1) ejercer un efecto benéfico en el huésped, 2) ser no patogénico, 3) contener un gran número de células viables, 4) ser capaz de sobrevivir y desarrollarse en el tubo digestivo, 5) permanecer viable durante el almacenamiento y utilización, 6) ser suministrado de una manera sensorialmente aceptable para el huésped y 7) preferentemente ser autóctono del ecosistema al que se va a incorporar (Collins y Gibson, 1999).

Algunas de las ventajas para la salud asociados con la ingesta de probióticos son: alivio de trastornos digestivos (trastornos en la digestión de la lactosa, acidosis ruminal, meteorismo, etc.), aumento de la resistencia natural a las enfermedades infecciosas del tracto intestinal, prevención del cáncer, reducción de las concentraciones de colesterol en suero, mejorar la digestión y estimulación de la inmunidad gastrointestinal (Collins y Gibson, 1999; Ried; 1999).

La presencia de probióticos es importante para el mantenimiento del ecosistema microbiano digestivo. Se ha demostrado que poseen actividad inhibitoria hacia el crecimiento de bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. Esta inhibición podría ser debido a la producción de compuestos inhibidores tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas o reuterina o a la adhesión competitiva al epitelio. Con el fin de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal, las bacterias probióticas deben expresar alta tolerancia a las diversas condiciones del tracto gastrointestinal que dependen del huésped del que se trate y tener la capacidad de adherirse a las superficies digestivas (Jacobsen y col., 1999; Callaway y col., 2004).

Entre los microorganismos seleccionados para su uso como probióticos en rumiantes encontramos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Megasphaera elsdenii*, *Enterococcus faecium* y otros, con distintos efectos benéficos. Algunos informes han demostrado poco efecto de la suplementación probiótica en el pH ruminal, amoníaco, ácidos grasos volátiles, y la digestión de fibra (Adams y col., 1981; Judkins y Stobart, 1988), mientras que otros investigadores han observado aumento de la fermentación del rumen y la digestión de la fibra (Wiedmeier y col., 1987; Nisbet y Martin, 1991).

El uso de *Saccharomyces cerevisiae* en rumiantes mejoró el consumo de materia seca y el rendimiento lechero en vacas en lactación consumiendo dietas ricas en concentrado, también actuando de forma indirecta por la estimulación de *Selenomonas ruminantium* incrementando su consumo de lactato (Williams y col., 1991; Nisbet y Martin, 1991). El éxito de las levaduras debe pasar por una suplementación diaria, pues las levaduras son incapaces de sobrevivir en el rumen (Newbold y col., 1995; Bach, 2002).

Hay trabajos en los que se ha utilizado *Megasphaera elsdenii* por su utilización del lactato evitando su acumulación y la producción de AGV (Counotte y col., 1981; Kung y Hession, 1995).

Nocek y Kautz (2006) trabajando con *Enterococcus faecium* en un experimento in vivo lograron mejoramiento general en la performance productiva en vacas lecheras.

Prebióticos

Un prebiótico es un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de determinadas cepas bacterianas (Gibson y Roberfroid, 1995). Éstas son potencialmente beneficiosas para la salud (Williams y col., 2005).

En comparación con un probiótico, que introduce bacterias exógenas en la microbiota del huésped, los prebióticos estimulan el crecimiento de un número limitado de microorganismos autóctonos potencialmente promotores de la salud, modulando la composición del ecosistema natural (Roberfroid, 2001).

Los prebióticos son destinados a modificar la micropoblación de tal manera que las actividades bacterianas beneficiosas para el huésped son estimuladas y las adversas para la salud del animal son suprimidas (Blaut, 2002).

Un prebiótico debe ser no degradable por enzimas del animal y estar, por lo tanto, potencialmente disponible para la fermentación por microorganismos del tracto gastrointestinal.

El estudio de los prebióticos surgió de la observación de la inulina y los fructooligosacáridos que estimulan selectivamente el crecimiento de las bifidobacterias y lactobacilos. Éstas se consideran beneficiosas para la salud humana por tener propiedades como acción inmunomoduladora, inhibición del crecimiento de patógenos, reducción de los niveles de colesterol en sangre y la restauración de la micropoblación intestinal normal durante la terapia con antibióticos (Blaut, 2002).

De los ingredientes de los alimentos disponibles en la actualidad, los oligosacáridos no digeribles son los únicos componentes conocidos en medicina humana de los que se ha informado pruebas convincentes de tener un efecto prebiótico. Por otra parte, de los oligosacáridos no digeribles disponibles en alimentos, los fructanos de tipo inulina son los prebióticos que se han investigado más ampliamente por sus propiedades nutricionales (Roberfroid, 2001). La inulina es un grupo de polímeros de fructosa (o fructanos) unidos por enlaces β (2-1) que limitan su digestión por enzimas intestinales superiores. Estos fructanos presentan de 2 a 60 cadenas moleculares de fructosa. La oligofructosa contiene de 2-10 residuos de monosacáridos de fructosa unidos por enlaces glucosídicos. Tanto la inulina como la oligofructosa se encuentran en muchas especies de plantas, incluyendo trigo, cebolla, plátano y achicoria (Duggan y col., 2002).

Aunque la mayoría de las investigaciones en humanos se ha hecho sobre la inulina y los fructooligosacáridos, otros oligosacáridos no digeribles incluyendo, xilooligosacáridos, galactooligosacáridos e isomaltooligosacáridos también han sido

probados por su efecto prebiótico. La mayoría de los candidatos a prebióticos son oligosacáridos, pero también incluyen polisacáridos (Blaut, 2002).

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

Las levaduras además de su efecto probiótico pueden utilizarse como prebióticos (mananooligosacáridos) lo que beneficia al hospedero en varios aspectos (Lipke y Ovalle, 1998). Los preparados a partir de levaduras inactivadas contienen minerales (Se, Cr), vitaminas (hidrosolubles del complejo B) y enzimas (fitasas); promueven el crecimiento, mejoran la eficiencia alimenticia, mejoran la absorción de nutrientes mediante el control de la diferenciación y proliferación de las células epiteliales del intestino; estimulan la inmunidad no específica y específica en el intestino y reducen el olor de las excretas (Castro y Rodríguez, 2005). Los mananooligosacáridos han mostrado efectos prebióticos en animales domésticos tales como reducción de patógenos, incremento en las fracciones de IgA en intestino, incremento de bacterias probióticas habitantes del intestino y mejora la digestibilidad de los alimentos (Spring y col., 2000; Swanson y col., 2002; Middelbos y col., 2007)

Los extractos de levaduras cuya dosis recomendada es de 3 g/d, deben suministrarse diariamente para obtener resultados. Éstos ayudarían a mantener el pH ruminal mediante el estímulo del crecimiento de las bacterias ruminales que fermentan el ácido láctico. De este modo, aunque se produzca ácido láctico, éste no se acumula en el rumen. Las bacterias capaces de utilizar el ácido láctico ruminal más importantes son la *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*. El crecimiento de estas especies, además de poder ser estimulado mediante levaduras, también lo puede ser mediante la adición de malato o fumarato a la ración (Bach, 2002). Martin y Streeter (1995) demostraron que el malato era un factor de crecimiento para estas especies y que su suplementación en la ración era beneficiosa para combatir la acidosis. El malato, aunque efectivo, no es barato. Una alternativa a la suplementación directa con malato es el uso de forrajes ricos en malato de forma natural como lo son algunas variedades de alfalfa y otras leguminosas (Bach, 2002).

Se ha demostrado que la adición de fracciones peptídicas de *Saccharomyces cerevisiae* mejora el crecimiento de *Megasphaera elsdenii*, bacteria que se considera el principal utilizador de lactato en el rumen, por lo tanto previene la aparición de acidosis láctica (Rossi y col., 2004).

Algunos ácidos orgánicos (como malato o fumarato) parecen inducir cambios en el pH ruminal y la producción de metano y/o AGV de una forma similar a la monensina. Sin embargo, su modo de acción parece ser completamente diferente ya que, en contraposición a los antibióticos, parecen estimular, y no inhibir, actividades

específicas dentro del metabolismo ruminal. Por ejemplo, el crecimiento de *Selenomonas ruminantium* se incrementó a más del doble en presencia de 10 mM de fumarato o L-malato. La utilización de ácido láctico se incrementó más de 4 veces con fumarato, y más de 10 veces con malato (Nisbet y Martin, 1993).

Los ácidos orgánicos malato o fumarato son precursores de la síntesis de propionato a través de un doble mecanismo: 1) estimulan la captación y transformación del lactato a propionato por medio de la bacteria *Selenomonas ruminantium* y 2) esta bacteria puede transformar dichos ácidos en succinato y propionato (Nisbet y Martin, 1990).

La reducción de la concentración de ácido láctico estabiliza el pH ruminal y la fermentación ruminal (Martin y Streeter, 1995; Callaway y Martin, 1996; Martin y col., 1999; Montaña y col., 1999). Sin embargo, la reducción en la concentración de lactato no explica completamente el aumento del pH. Callaway y Martin (1996) y Martin y col. (1999) sugirieron que los ácidos orgánicos aumentaban el pH ruminal por un doble mecanismo: la reducción de la concentración de lactato, y la producción de CO₂ que tampona el líquido ruminal.

La producción de gas en cultivos *in vitro* demuestran que en la mayor parte de los casos la adición de malato aumenta la producción total de gas y la degradabilidad de la materia seca (Martin y Streeter, 1995; Callaway y Martin, 1996), indicando que la fermentabilidad de la ración mejoró como resultado del incremento de la población bacteriana o de su actividad.

Nisbet y Martin (1991) observaron que la adición de malato y fumarato hasta alcanzar concentraciones de 10 mM duplica el crecimiento de *Selenomonas ruminantium*. Esta bacteria es útil en la captación y utilización del lactato, evitando su concentración en el rumen, lo cual, unido a la producción de CO₂, contribuye a aumentar el pH (Martin y col., 1999). El CO₂ es un producto final de la fermentación del lactato a propionato por la vía del succinato-propionato, que es utilizada por *Selenomonas ruminantium* (Callaway y Martin, 1996). Nisbet y Martin (1990) observaron que tanto el malato como el fumarato aumentan la captación (4 veces) y la utilización (10 veces) del ácido láctico por *Selenomonas ruminantium*.

Martin y Streeter (1995) observaron que la adición de malato disminuyó la producción de lactato (4-8%), incrementó el pH (1-3%) del líquido ruminal y aumentó las concentraciones de AGV totales (4-33%).

Martin y col. (1999), observaron aumentos de pH como consecuencia de la administración de malato, en una prueba realizada con 4 terneros. Se les suministró malato (0, 27, 54, 80 g/día) vía cánula ruminal, obteniendo un aumento lineal de pH ruminal en los animales con la dosis más alta de malato (pH 6,2) comparado con el control (pH 5,8). También observaron que la adición de malato produjo en los terneros un aumento lineal de la ganancia de peso y la eficacia alimentaria.

Montaña y col. (1999), en un experimento con terneros canulados en el rumen, alimentados 2 veces al día con una ración con copos de cebada suplementada con

ácido málico (80 g/d), observaron que el descenso de pH ruminal producido a las dos o tres horas tras la oferta de comida era menos acusado cuando los animales recibían el ácido. A su vez, Newbold y col. (1996) demostraron que la suplementación con 100 mg/día de ácido málico incrementó el número total de bacterias y la población de celulolíticos.

Bauchart y col. (1985), realizaron un estudio con terneros alimentados con sustitutos lácteos con agregado de sorbitol. Se observó un efecto hipocolesterolémico en el plasma y músculo de dichos animales mejorando la calidad dietética de la carne.

En otro estudio realizado con terneros canulados suplementados con sorbitol en leche, Thivend y col. (1984) observaron un aumento del efecto colerético y colecistoquinético de la vesícula biliar, lo cual podría aumentar la digestión en el intestino delgado.

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

El sorbitol ha demostrado efectos inhibidores sobre patógenos tales como E. Coli O157:H7 en un estudio *in vitro* con líquido ruminal ovino (de Vaux y col., 2002).

Simbióticos

Los simbióticos consisten en la combinación de probióticos y prebióticos. Las adiciones de microorganismos vivos (probióticos) puede ser usado en conjunción con sustratos específicos (prebióticos) para el crecimiento (por ejemplo, un fructooligosacáridos en conjunción con una bifidobacteria o lactitol en conjunción con un lactobacilo). Esta combinación podría promover la supervivencia del organismo probiótico, porque su sustrato específico es fácilmente disponible para la fermentación (Collins y Gibson, 1999).

El concepto simbiótico implica un probiótico útil, incorporado en un vehículo dietético apropiado y un prebiótico adecuado. Se basa en el hecho de que tanto la estructura de los hidratos de carbono y las especies bacterianas presentes en el ecosistema son factores importantes para el manejo de la microflora gastrointestinal, y por lo tanto tiene como objetivo mejorar la supervivencia de los probióticos en un ambiente hostil, ofreciendo un sustrato de crecimiento fácilmente disponible. Un simbiótico se define así como, una mezcla de probióticos y prebióticos que afecta beneficiosamente al huésped mediante la mejora de la supervivencia y la implantación de suplemento dietético vivo microbiano en el tracto gastrointestinal (Gibson y Roberfroid 1995).

Técnicas de producción de gas

Para el estudio de la fisiología ruminal, se ha recurrido a distintos métodos: técnicas *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Las técnicas *in vivo* permiten obtener resultados reales. Sin embargo, presentan ciertos inconvenientes como por ejemplo su elevado costo, mayor tiempo de realización y se requiere cierta infraestructura. Al trabajar con animales vivos hay dificultades de manejo y además hay una gran variabilidad animal, que si bien se reduce en cierta forma gracias al diseño experimental es difícil hacerla desaparecer completamente. Por otra parte, la preparación quirúrgica de los animales en alguno de estos estudios puede plantear además problemas éticos y morales (Mould y col., 2005; Gosselink y col., 2004).

Las técnicas *in situ* permiten estudiar las interacciones dinámicas de la digestión, mediante la incubación de muestras colocadas en bolsas en el rumen de animales fistulizados. Dichas técnicas presentan la ventaja comparado a los métodos *in vitro* de que se realizan directamente en el entorno digestivo que nos interesa estudiar sin necesidad de simular dicho ambiente evitando las imprecisiones de la misma (Udén y Van Soest, 1984; Vanzant y col., 1998). Respecto a los métodos *in vivo* presentan la ventaja de reducir el número de animales así como reducir la variabilidad a condiciones más manejables. Sin embargo presentan algunas desventajas compartidas con los métodos *in vivo*, ya que es un proceso laborioso y costoso (Giraldo y col., 2007).

Los métodos *in vitro*, de los cuales hay gran variedad, pero que en general permiten tener mayor control sobre los experimentos haciéndolos más simples, de menor duración y menor costo (Carro y col., 2005; Fondevila y Pérez-Espes, 2008). Esta practicidad está acompañada por ciertas limitaciones debido justamente a que no se trata de animales vivos, sino de modelos simplificados de algunas funciones digestivas de ellos. Por esto y para tener mayor control de los experimentos se seleccionan algunas características y se controlan o limitan otras (Krizsan y col., 2007; Benchaar y col., 2007).

Las técnicas de fermentación con medición del gas acumulado *in vitro*, fueron desarrolladas para estudiar la capacidad digestiva del rumen, pudiendo realizar además otros estudios como la cinética de fermentación, cuantificación de algunos ácidos orgánicos específicos, AGV totales, la determinación del pH, medición de amoníaco, producción de hidrógeno y metano (Martin y Nisbet, 1990; Nisbet y Martin, 1991; Callaway y Martin, 1996; Martin, 1998). Los primeros en desarrollarlas fueron Mc Bee en 1953 y Hungate en 1966. Wilkins (1974) describió un sistema de fermentación que se llevó a cabo en un recipiente sellado y el gas producido se determinó usando un transductor para medir la presión acumulada en el espacio superior del vaso. Czerkowsky y Breckenridg (1975) estudiaron el desplazamiento directo de un émbolo por la fermentación de un alimento dentro de una jeringa de vidrio. Luego Menke y col (1979) desarrollaron un sistema de jeringas calibrado con incubación del sustrato con medición de la producción de gas en un período de 96 hs. Blummel y Ørskov (1993) modificaron la técnica mediante la incubación de las jeringas en un baño de agua en lugar de una incubadora giratoria. Theodorou y col. (1994) describieron la técnica manual de medición de presión en el espacio superior

del vaso. Más tarde se desarrollaron técnicas automáticas y semiautomáticas para el registro de presión, descritas por otros autores (Pell y Schofield, 1993; Cone y col., 1996; Mauricio y col., 1999; Davies y col., 2000; Rymer y col., 2005).

A partir de estos estudios se han desarrollado múltiples tipos de dispositivos que en la actualidad son muy variados, incluyendo métodos estáticos y métodos dinámicos con diverso grado de complejidad (Czerkawsky y Breckenridg, 1977; Gosselink y col., 2004).

La función de un medio de incubación *in vitro* es crear y mantener un ambiente adecuado para el proceso fermentativo. Esto se logra mediante la incubación de una cantidad conocida de alimento en líquido ruminal en un medio anaeróbico, el suministro de nutrientes suplementarios y un sistema tampón que simula la acción de la saliva para mantener el pH del medio, de tal manera que la degradación no se vea comprometida. Dichas muestras son incubadas a temperatura constante (39°C). Por medio de este proceso fermentativo podemos determinar la degradación de los alimentos por el monitoreo de las tasas de producción de gas durante determinados intervalos (Fondevila y Pérez-Espes, 2008).

Agentes reductores

Para lograr un ambiente anaeróbico se utilizan soluciones reductoras que disminuyen el potencial redox. Hungate (1966) recomendó la utilización agentes reductores tales como clorhidrato de cisteína y sulfuro de sodio. Menke (1979) y Beuvink y Spoeltra (1992) utilizaron sulfuro de sodio, más tarde Theoderou (1992) combinó porciones iguales de clorhidrato de cisteína y sulfuro de sodio. Fukushima (2003) informó que el clorhidrato de cisteína presenta menor toxicidad para algunas bacterias anaeróbicas, pero logra un menor potencial redox comparado al sulfuro de sodio. Sin embargo, Tilley y Terry (1963) para lograr condiciones anaeróbicas durante la fase de fermentación saturaron las soluciones con CO₂ antes de su uso, sin incorporar agentes reductores.

pH

Un factor clave en el desarrollo de la actividad fermentativa es tener en cuenta el pH de incubación, lo que determina el equilibrio de la población microbiana. En las técnicas de producción de gas *in vitro*, la mayoría de los sistemas utilizan como amortiguador del pH HCO₃/CO₂ con la adición de fosfato (Fondevila y Pérez-Espes, 2008). Estos amortiguadores son útiles para mantener el pH entre 6,7-6,8. Una forma sencilla de mantener el pH bajo es reducir la concentración de HCO₃, disminuyendo la capacidad de amortiguación, lo que lleva a un descenso del pH por acumulación de AGV (Kohn y Dunlap, 1998). Una estrategia para este problema, teniendo en cuenta que la mayoría de los estudios son de larga duración (96 hs), sería suministrar periódicamente una baja concentración de buffer.

Grant y Mertens (1992) registraron disminuciones de volumen de gas producido, desaparición de materia seca y concentración total de AGV a pH 6,1 en comparación con 6,8. Según el pH inicial de incubación los resultados de los estudios pueden variar. Estos indican que cuando el pH es inferior a 6,2 se reduce la degradación de

la fibra que puede ser debido por disminución de la colonización microbiana y alteración en el crecimiento de bacterias fibrolíticas. El medio ambiente también se vio afectado por disminución de acetato, mayor proporción de propionato y butirato.

Kozloski y col. (2007) informaron que el bajo pH ruminal disminuye la degradación de la fibra, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, la colonización microbiana promedio, no se vio afectada significativamente por el pH inicial.

Otros estudios evalúan el descenso de pH durante la fermentación iniciando con valores de líquido ruminal normal (6,8), por lo que se varía la estrategia cambiando la composición de la saliva por una de menor tamponamiento que permite evidenciar los cambios a lo largo del tiempo. Estos estudios son de menor duración, alcanzando unas 24 hs (Aldrovandi y col., 2009).

Inóculo

El inóculo debe ser representativo del medio ambiente con respecto a las especies microbianas y su concentración, siendo su propósito principal generar una microflora adecuada para la fermentación o degradación del alimento a través del tiempo, y utilizar el resultado para estimar la tasa de digestibilidad *in vitro*. Sin embargo, pueden existir variaciones en el inóculo dependiendo del tipo de nutrición del animal, tiempo de muestreo, animal donador, preparación de las muestras e inoculación. Pequeñas variaciones en el inóculo pueden tener importantes efectos acumulativos en la producción de gas, por lo tanto para limitar los posibles errores debemos tener mucho cuidado en el manejo animal, técnicas de muestreo y preparación (Mould y col., 2005). Mohamed y col. (2002) examinaron la degradabilidad *in vitro* de inóculos de muestras frescas y almacenadas a -20°C por 10 semanas, y observaron que el fluido ruminal fresco produjo los mayores niveles de degradabilidad en un período de incubación de 96 hs. Algunos autores sugieren que el líquido ruminal congelado debe ser utilizado solamente cuando el líquido ruminal fresco no esté disponible (Chaudhry y col., 2012).

Producción de gas

La técnica de producción de gas es un método útil para estimar la velocidad y magnitud de degradación de un alimento, ofreciendo información detallada de la cinética de fermentación de los alimentos. La fermentación microbiana de los alimentos produce CO_2 , metano y AGV. El gas medido por esta técnica se produce directamente a partir de la fermentación o indirectamente por los AGV que reaccionan con el bicarbonato incluido en el medio de incubación (Beuvink y Spoelstra, 1992; Palmer y col., 2005;).

Getachew y col. (2005), en un experimento *in vitro* evaluaron la calidad nutricional de siete raciones comerciales mixtas según la producción total de gas y la producción de metano. Las estimaciones de la cantidad de metano producido a partir de este experimento *in vitro* fueron similares a los determinados *in vivo*, lo que sugiere que se puede utilizar para estimar la producción de metano *in vivo*, y así realizar cambios en los ingredientes de la dieta y/o la inclusión de aditivos en el alimento para

modificar el ambiente ruminal, como por ejemplo para deprimir el crecimiento de bacterias metanogénicas en el rumen.

Desde una perspectiva práctica, hay una serie de fuentes de variación en la estimación de la producción de gas. Éstas incluyen el aparato usado, las especies de inóculo donante, la dieta de los animales donantes, la preparación del líquido ruminal y el sustrato (Rymer y col., 2005).

HIPÓTESIS

Los potenciales prebióticos a evaluar tendrán un efecto modulador de la biota ruminal en un experimento *in vitro* en el que se simula acidosis ruminal. Esto se comprobará a través de la medición de dos variables: pH y volumen acumulado de gas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Comparar los efectos de cinco potenciales prebióticos (*Saccharomyces cerevisiae* inactivada, inulina, sorbitol, ácido málico y malato de sodio) sobre el pH como medida de la acidez del medio y sobre la producción de gas como medida de la actividad microbiana, en un ensayo *in vitro* realizado en fermentadores estáticos simulando una acidosis ruminal.

Objetivos particulares:

- Tratar de establecer cual concentración de los potenciales prebióticos tendrá mayor efecto modulador, amortiguando la acidosis simulada.
- Evaluar cual variable (pH o producción acumulada de gas) es la más apropiada para estudiar los cambios ocurridos en este tipo de experimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de fermentación

Se empleó un sistema de fermentación estático de tipo anaeróbico con un leve tamponamiento incubado a corto tiempo (24 horas) similar a la metodología seguida por Aldrovandi y col., 2009. Cada unidad experimental consistió en el uso de un frasco de vidrio de 125 mL de color caramelo precintado herméticamente, donde se colocaron los componentes detallados a continuación.

Como inóculo se utilizaron 10 mL de líquido ruminal fresco, obtenido de una vaca lechera canulada, alimentada a base de pasturas, ensilado y concentrado. El líquido se extrajo inmediatamente antes de su uso, se tamizó y recogió en un recipiente térmico manteniéndolo con un borboteo continuo de CO₂ para mantener la anaerobiosis.

El alimento utilizado fue forraje (mezcla de gramíneas y leguminosas en estado vegetativo) y granos de cebada molidos, con la siguiente proporción: 50% de forraje y 50% de granos de cebada (como materia seca).

Las sustancias a evaluar como potenciales prebióticos fueron *Saccharomyces cerevisiae* inactivada, inulina, sorbitol, ácido málico y malato de sodio. Éstas se colocaron junto con el alimento a las dosis de 15, 45 y 75 mg para completar 500 mg de sustrato, lo que representó el 3, 9 y 15% respectivamente.

Se utilizaron 0,5 mL de una solución de Na₂S al 6% como agente reductor.

Como solución tampón se usaron 40 mL de saliva artificial modificada por Aldrovandi y col., 2009 (tabla 3).

Tabla 3. Saliva artificial (solución tampón). Según Aldrovandi y col., 2009. (Contenido para 1 L).

Fórmula ajustada	
Reactivo	Cantidad
NaHCO ₃	4,00 g
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,59 g
KH ₂ PO ₄	0,45 g
Na Cl	1,00 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,09 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,12 g
Hemina	0,01 g

Diseño experimental

Se evaluaron 5 aditivos: *Saccharomyces cerevisiae* inactivada (SCI), inulina (INU), sorbitol (SOR), ácido málico (MAL) y malato de sodio (MDS), cada uno a 3 dosis (3, 9 y 15% del sustrato total). Se agregaron 2 tratamientos control, uno sólo con líquido ruminal y saliva artificial (TSS) para evaluar la vitalidad de la biota ruminal y otro que reprodujo la acidosis incluyendo líquido ruminal, saliva artificial y sustrato sin aditivos (TAC).

Para la medición del pH en cada tiempo (0, 4, 12 y 24 horas) se realizó la apertura de los sistemas, por lo que se utilizaron cuatro conjuntos completos de unidades experimentales. Cada conjunto estaba constituido por las 3 dosis de cada sustancia a testar más los 2 controles, cada uno por triplicado, totalizando 51 unidades experimentales.

Desarrollo del experimento

Tres de los cuatro conjuntos experimentales se incubaron en baño de agua a 39°C en forma estática. Los frascos se ubicaron de manera que todos los tratamientos se distribuyeran equilibradamente en el baño. Un conjunto completo de unidades experimentales se preparó sin fermentar para tener medidas del tiempo cero.

Mediciones realizadas

Producción de gas

La producción de gas se midió en forma indirecta, a partir de la presión de gas en el espacio superior de los frascos. Se registró la presión interna en los sistemas de fermentación, mediante un manómetro (Sper Scientific 840065, E.E.U.U.) y luego se convirtió a volumen utilizando para ello una ecuación desarrollada para estas condiciones experimentales (Theodorou y col., 1994; Mauricio y col., 1999; Senger y col., 2007). Luego de cada medida se igualó la presión interna con la atmosférica.

Los tiempos de medida fueron los siguientes: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 horas respecto al inicio de la fermentación.

El volumen registrado para cada frasco se sumó a los de los horarios anteriores, obteniendo entonces la variable a utilizar que fue el volumen acumulado o producción acumulada de gas.

Medida de pH

La medición del pH se realizó con un pHímetro digital (Oakton, Acorn pH 5, E.E.U.U.) con electrodo combinado. Se requirió para cada medición (excepto la del tiempo cero), la extracción y apertura de un conjunto completo de unidades experimentales, las cuales se hicieron a las 4, 12 y 24 horas desde el comienzo del experimento.

Análisis estadístico

Para pH y producción acumulada de gas se realizó ANOVA con un $p = 0,05$ entre todos los tratamientos, para cada tiempo y como test *a posteriori* se aplicó HSD de Tukey.

RESULTADOS

Medida de pH

En la Tabla 4 se presentan los valores promedio de pH de cada sustancia testada y de los dos controles obtenidos para cada tiempo.

En el tiempo 0 la única sustancia que presentó diferencias significativas fue el MAL a la dosis de 15% con valor inferior al TAC.

A las 4 horas no se encontraron diferencias significativas entre las sustancias testadas y TAC.

A la hora 12 el MDS a la dosis de 15% registró los mayores valores de pH siendo la única sustancia que se diferenció de TAC. SCI a todas las dosis y MDS al 3 y 9% también tuvieron buenos resultados pero sin alcanzar una diferencia significativa con TAC.

A las 24 horas nuevamente se destacó el MDS a la mayor dosis por presentar los valores de pH más altos. SCI al 9 y 15% y MDS al 9% registraron valores de pH superiores al control pero sin llegar a una diferencia significativa con TAC.

Mirando la evolución del pH en los fermentadores encontramos que a partir de las 4 horas se marcan algunas tendencias sin llegar a dar diferencias significativas. Las diferencias se consolidan en los tiempos de 12 y 24 horas (Ver figuras 1, 2, 3, 4 y 5).

Tabla 4. Análisis de los datos de pH en cada tiempo de apertura. Los datos corresponden a los valores medios para cada tratamiento en cada tiempo.

	Dosis (%)	TSS*	TAC [§]	SCI	INU	SOR	MAL	MDS	Media Gral ± DE
0 hs	3			6,67 ^a	6,68 ^a	6,66 ^a	6,62 ^a	6,67 ^a	
	9	6.61	6,58 ^a	6,77 ^a	6,72 ^a	6,70 ^a	6,42 ^a	6,51 ^a	6,61 ± 0,16
	15			6,69 ^a	6,72 ^a	6,68 ^a	6,19 ^b	6,43 ^a	
4 hs	3			6,12 ^b	6,14 ^b	6,12 ^b	6,14 ^b	6,16 ^b	
	9	6.46	6,08 ^{ab}	6,18 ^b	6,08 ^{ab}	6,13 ^b	6,09 ^b	6,15 ^b	6,13 ± 0,10
	15			6,18 ^b	6,03 ^{ab}	6,12 ^b	5,98 ^a	6,13 ^b	
12 hs	3			5,65 ^{abcd}	5,61 ^{abc}	5,59 ^{abc}	5,63 ^{abcd}	5,65 ^{abcd}	
	9	6.37	5,58 ^{abc}	5,70 ^{abcd}	5,59 ^{abc}	5,57 ^{ab}	5,58 ^{abc}	5,72 ^{bcd}	5,68 ± 0,19
	15			5,74 ^{cd}	5,60 ^{abc}	5,54 ^a	5,58 ^{abc}	5,78 ^d	
24 hs	3			5,42 ^b	5,39 ^b	5,37 ^{ab}	5,38 ^{ab}	5,40 ^b	
	9	6.39	5,37 ^{ab}	5,44 ^{bc}	5,36 ^{ab}	5,30 ^{ab}	5,38 ^{ab}	5,48 ^{bc}	5,45 ± 0,25
	15			5,47 ^{bc}	5,31 ^{ab}	5,26 ^a	5,34 ^{ab}	5,57 ^c	

Notas: Letras en superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ($p < 0,05$). Se incluyeron para cada tiempo la media general y el desvío estándar.

* El tratamiento TSS se incluyó para monitorear la vitalidad del líquido ruminal a lo largo del ensayo. No se tuvo en cuenta para el análisis estadístico, por no aportar información relevante.

§ El tratamiento TAC se correspondió al control que simulaba la acidosis ruminal.

En la Figura 1 se observa el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* inactivada a las dosis de 3, 9 y 15% en la dinámica del descenso de pH a lo largo del tiempo. También se representan los 2 controles. Los tres tratamientos presentaron valores de pH por encima de TAC. No se observan diferencias significativas respecto a la dosis.

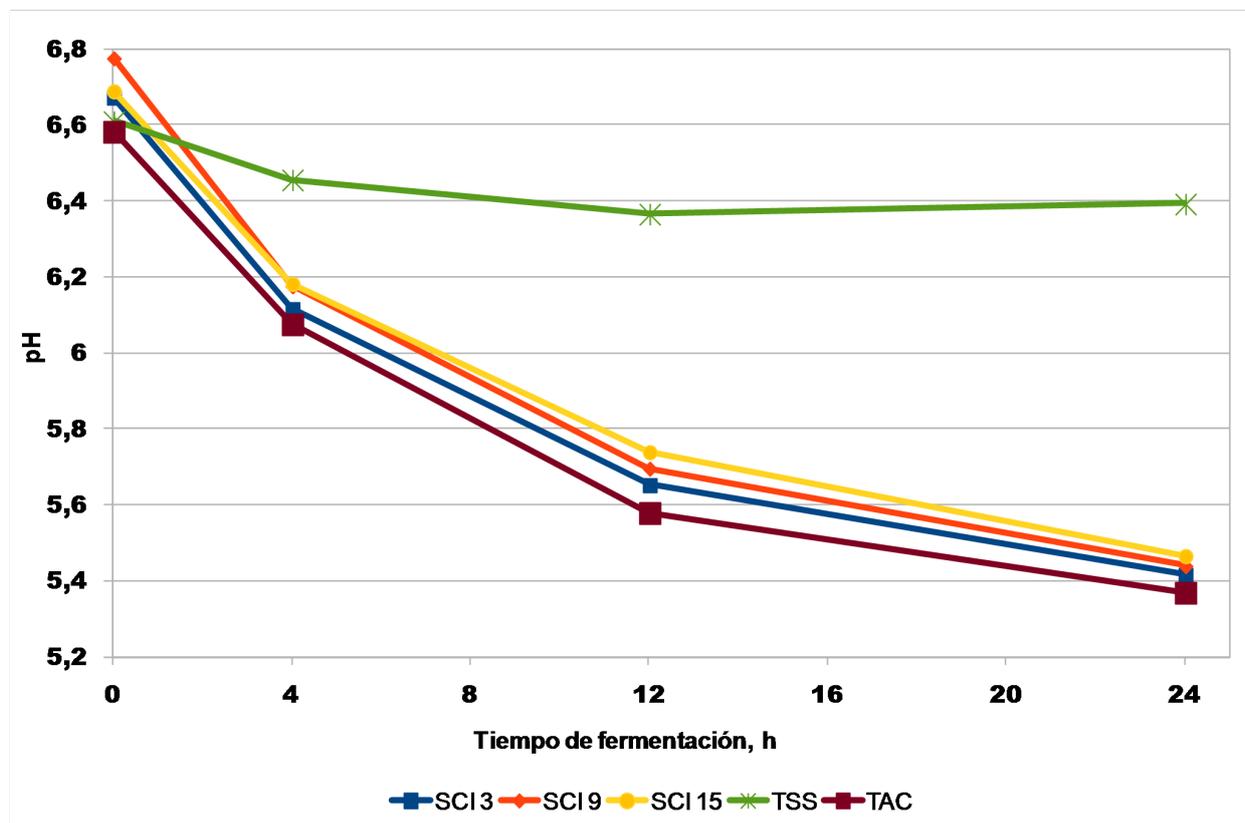


Figura 1. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de *Saccharomyces cerevisiae* inactivada en tres dosis.

En la Figura 2 se observa el efecto de la adición de inulina a las dosis de 3, 9 y 15% en la dinámica del descenso de pH a lo largo del tiempo. También se representan los 2 controles. El tratamiento de Inulina al 3% fue el único que a lo largo de las 24 horas presentó valores de pH por encima de TAC. Los tratamientos de inulina a las dosis de 9 y 15% presentaron oscilaciones a lo largo del tiempo terminando a las 24 horas con valores de pH por debajo de TAC.

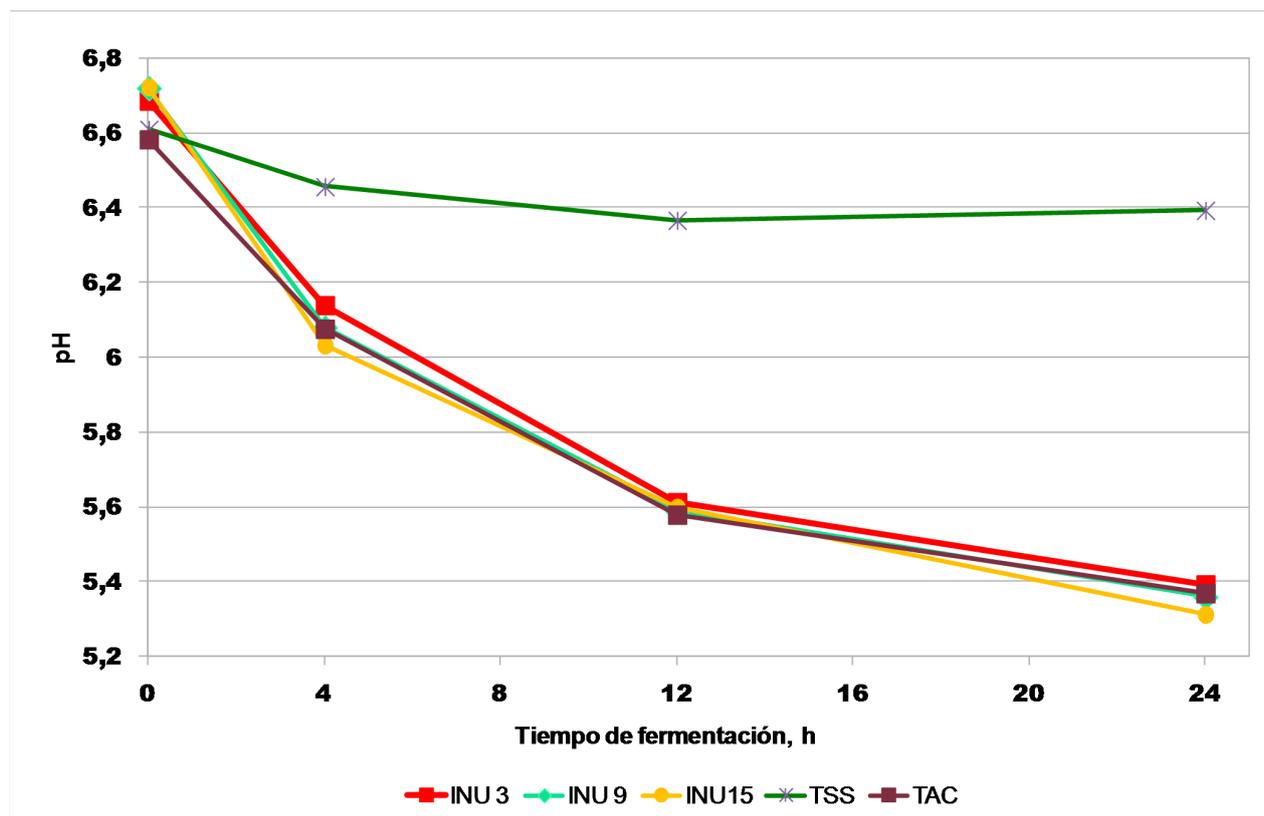


Figura 2. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de inulina en tres dosis.

En la Figura 3 se observa el efecto de la adición de sorbitol a las dosis de 3, 9 y 15% en la dinámica del descenso de pH a lo largo del tiempo. También se representan los 2 controles. A las 4 horas los 3 tratamientos presentaron valores de pH por encima de TAC, pero luego el pH descendió llegando a las 24 horas a valores inferiores respecto a TAC.

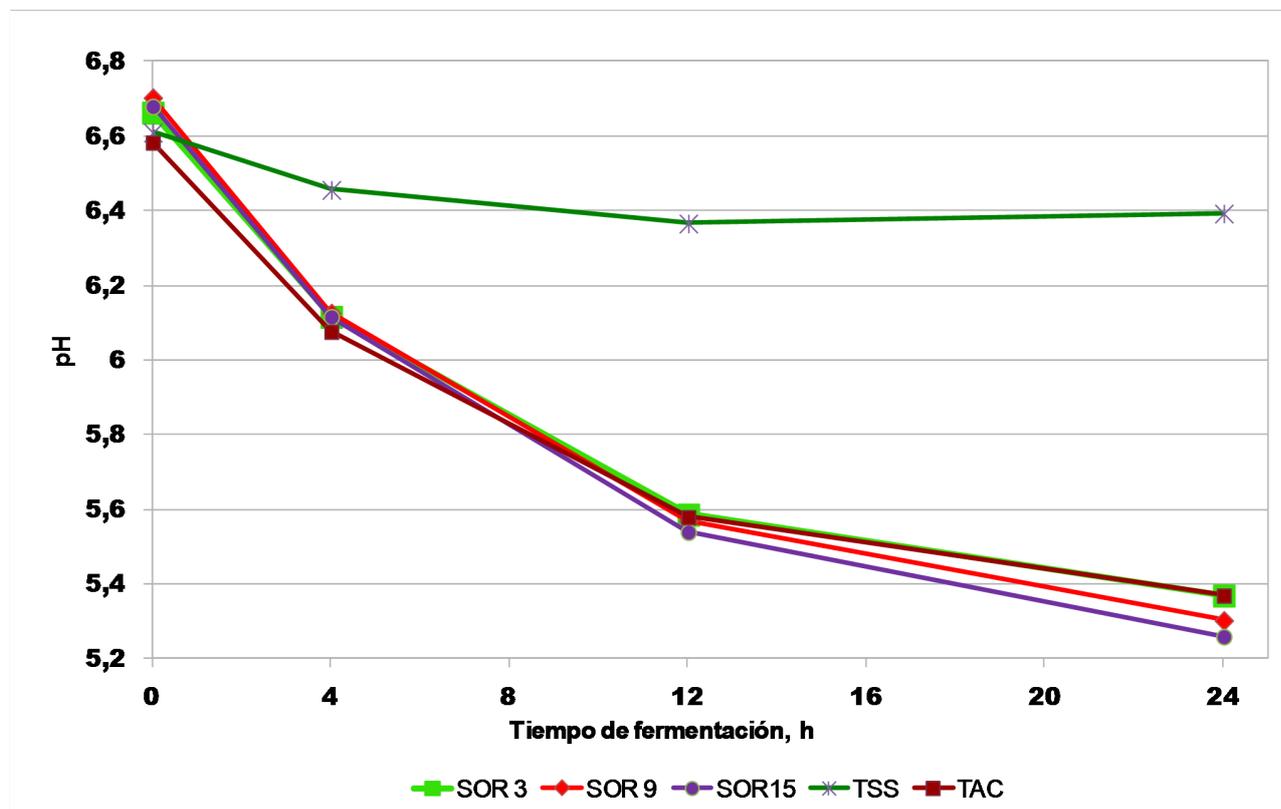


Figura 3. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de sorbitol en tres dosis.

En la Figura 4 se observa el efecto de la adición de ácido málico a las dosis de 3, 9 y 15% en la dinámica del descenso de pH a lo largo del tiempo. También se representan los 2 controles. El tratamiento de ácido málico a la dosis de 15% presentó a lo largo de las 24 horas valores de pH inferiores a TAC. La dosis de 9% presenta un pH inicial inferior a TAC pero luego los valores de pH se modulan, llegando a valores muy similares a TAC. La dosis de 3% fue la que presentó mayor desempeño en la amortiguación del pH, pero sin tener diferencias significativas respecto a TAC.

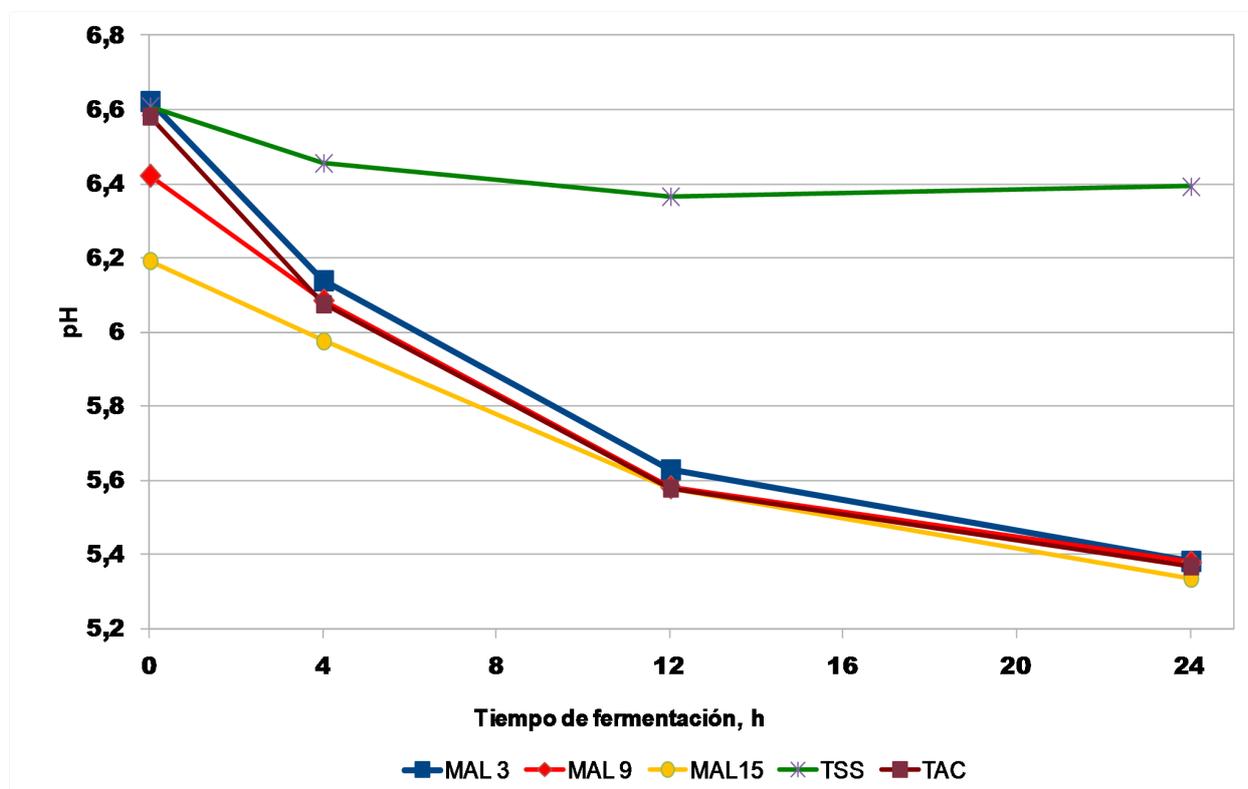


Figura 4. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de ácido málico en tres dosis.

En la Figura 5 se observa el efecto de la adición de malato de sodio a las dosis de 3, 9 y 15% en la dinámica del descenso de pH a lo largo del tiempo. También se representan los 2 controles. Los tratamientos de malato de sodio a las dosis de 9 y 15% presentaron un pH inicial por debajo de TAC, pero luego los valores de pH se modulan a lo largo del experimento teniendo valores superiores a TAC. A las 24 horas las 3 dosis de malato de sodio presentaron valores de pH por encima de TAC, pero la dosis de 15% fue la única que presentó diferencias significativas.

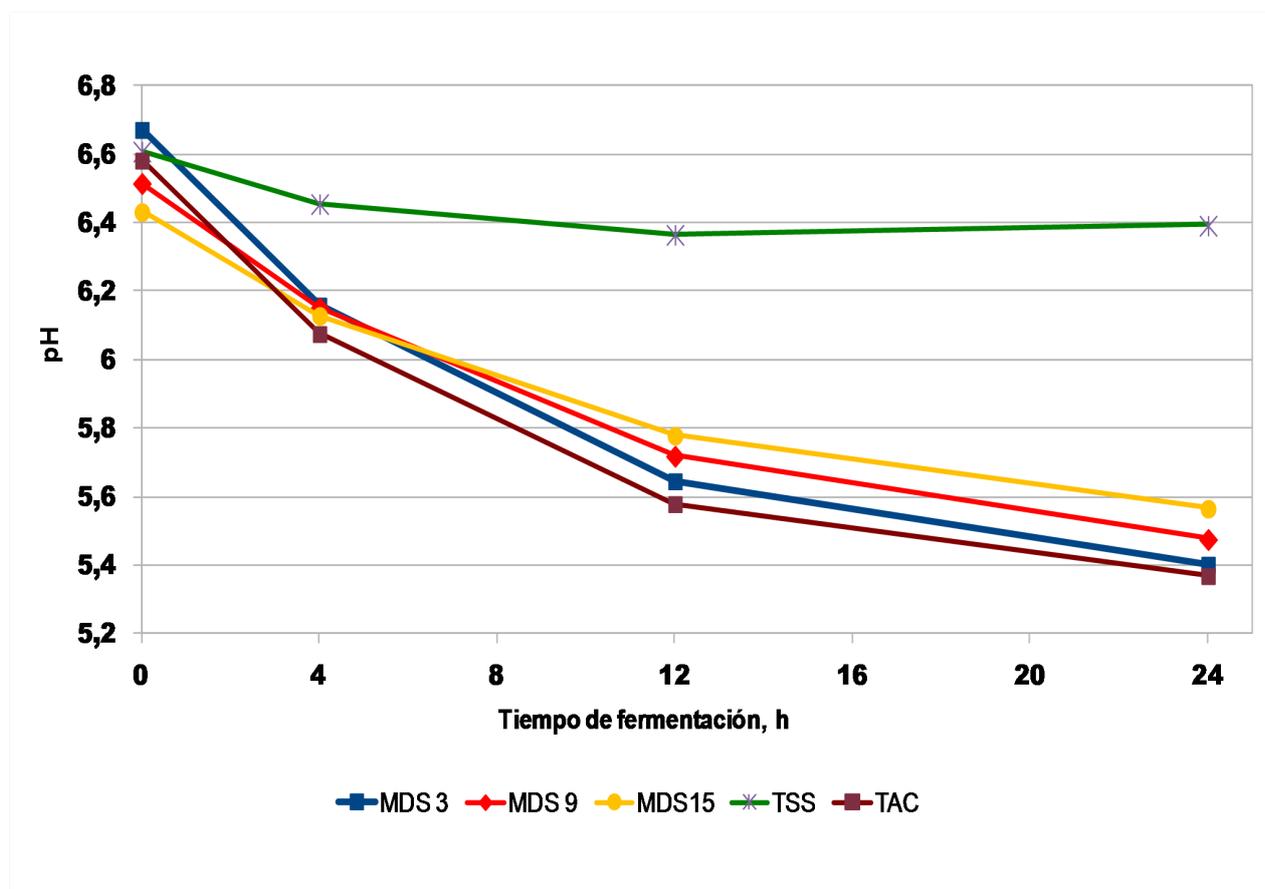


Figura 5. Evolución del pH en los fermentadores a lo largo del tiempo para los tratamientos de malato de sodio en tres dosis.

Producción de gas

En la Tabla 5 se presentan los valores medios de producción acumulada de gas (mL/g) de todas las sustancias testadas y el control de acidosis (TAC) obtenidos para cada tiempo.

A las 2 horas las sustancias que tuvieron mayores valores de producción de gas fueron SCI al 15% y MDS al 15% diferenciándose significativamente de TAC.

A la hora 4 se obtuvieron valores con diferencias significativas mayores de TAC de SCI al 9 y 15%, INU al 9 y 15% y MDS al 9 y 15%.

A las 6 horas se destacaron por mayor producción de gas las sustancias SCI al 9 y 15%, INU al 15%, SOR al 9% y MDS al 9 y 15% diferenciándose significativamente de TAC.

A las horas 8 y 10 las sustancias que presentaron un mayor desempeño fueron SCI al 9 y 15%, INU al 9 y 15%, SOR al 9% y MDS al 3, 9 y 15% con diferencias significativas con TAC.

A las 12, 18 y 24 horas el único que presentó diferencias significativas con respecto a TAC fue MDS a las dosis de 9 y 15%.

Tabla 5. Análisis de los datos de producción de gas acumulado (mL/g). Los datos corresponden a los valores medios para cada tratamiento en cada tiempo.

	Dosis (%)	TAC	SCI	INU	SOR	MAL	MDS	Media Gral ± DE
2 hs	3		4,17 ^a	4,47 ^{ab}	4,23 ^a	3,95 ^a	4,20 ^a	4,38 ± 0,46
	9	3,87 ^a	4,55 ^{ab}	4,50 ^{ab}	4,16 ^a	4,54 ^{ab}	4,41 ^{ab}	
	15		4,95 ^b	4,28 ^{ab}	3,93 ^a	4,60 ^{ab}	5,28 ^b	
4 hs	3		11,28 ^{ab}	11,80 ^{ab}	11,19 ^{ab}	10,85 ^{ab}	11,18 ^{ab}	11,73 ± 1,20
	9	9,85 ^a	12,35 ^{bc}	12,78 ^{bc}	11,62 ^{ab}	11,22 ^{ab}	12,48 ^{bc}	
	15		12,42 ^{bc}	14,15 ^c	10,47 ^{ab}	10,88 ^{ab}	13,14 ^{bc}	
6 hs	3		19,69 ^{abcd}	19,95 ^{abcd}	19,23 ^{abcd}	19,03 ^{abcd}	20,06 ^{abcde}	20,14 ± 1,73
	9	17,09 ^a	21,34 ^{cde}	21,13 ^{bcde}	20,77 ^{bcde}	19,18 ^{abcd}	21,95 ^{de}	
	15		20,83 ^{bcde}	23,03 ^e	18,93 ^{abc}	18,14 ^{ab}	21,90 ^{cde}	
8 hs	3		27,67 ^{abcd}	27,60 ^{abcd}	26,88 ^{abc}	26,81 ^{abc}	28,50 ^{bcd}	28,07 ± 1,95
	9	24,37 ^a	29,39 ^{bcd}	28,46 ^{bcd}	29,42 ^{cd}	26,87 ^{abc}	30,98 ^d	
	15		28,66 ^{bcd}	30,16 ^{cd}	27,25 ^{abc}	25,90 ^{ab}	30,20 ^{cd}	
10 hs	3		34,71 ^{abcd}	34,23 ^{abcd}	33,68 ^{abc}	33,69 ^{abc}	35,64 ^{bcde}	34,92 ± 2,16
	9	31,2 ^a	36,21 ^{cde}	34,94 ^{bcd}	36,23 ^{cde}	33,44 ^{abc}	38,81 ^e	
	15		35,28 ^{bcde}	36,28 ^{cde}	34,16 ^{abc}	32,28 ^{ab}	37,88 ^{de}	
12 hs	3		40,37 ^{ab}	39,64 ^a	38,85 ^a	39,29 ^a	41,64 ^{abc}	40,72 ± 2,42
	9	37,06 ^a	41,60 ^{abc}	40,23 ^{ab}	41,60 ^{abc}	40,53 ^{abc}	45,17 ^{bc}	
	15		40,92 ^{abc}	41,28 ^{abc}	40,73 ^{abc}	37,98 ^a	44,65 ^c	
18 hs	3		48,19 ^{ab}	47,41 ^a	46,48 ^a	47,19 ^a	49,70 ^{ab}	48,51 ± 2,94
	9	43,94 ^a	49,24 ^{ab}	47,85 ^{ab}	49,17 ^{ab}	48,67 ^{ab}	53,67 ^b	
	15		48,89 ^{ab}	48,48 ^{ab}	47,86 ^{ab}	45,85 ^a	53,55 ^b	
24 hs	3		54,01 ^{abc}	53,28 ^{ab}	52,24 ^a	53,03 ^{ab}	55,61 ^{abc}	54,35 ± 3,26
	9	49,54 ^a	54,98 ^{abc}	53,63 ^{abc}	55,04 ^{abc}	55,01 ^{abc}	59,85 ^{bc}	
	15		54,67 ^{abc}	54,22 ^{abc}	52,97 ^a	51,20 ^a	60,30 ^c	

Nota: Letras en superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para cada tiempo ($p < 0,05$). Se incluyen para cada tiempo la media general y el desvío estándar.

En las Figuras 6, 7, 8, 9 y 10 se observa el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* inactivada, inulina, sorbitol, ácido málico y malato de sodio sobre la producción de gas en un período de 24 horas. También se representa el control de acidosis.

Todos los tratamientos presentaron mayor producción de gas que TAC, pero los únicos que presentaron diferencias significativas a partir de las 12 horas fueron malato de sodio al 9 y 15%.

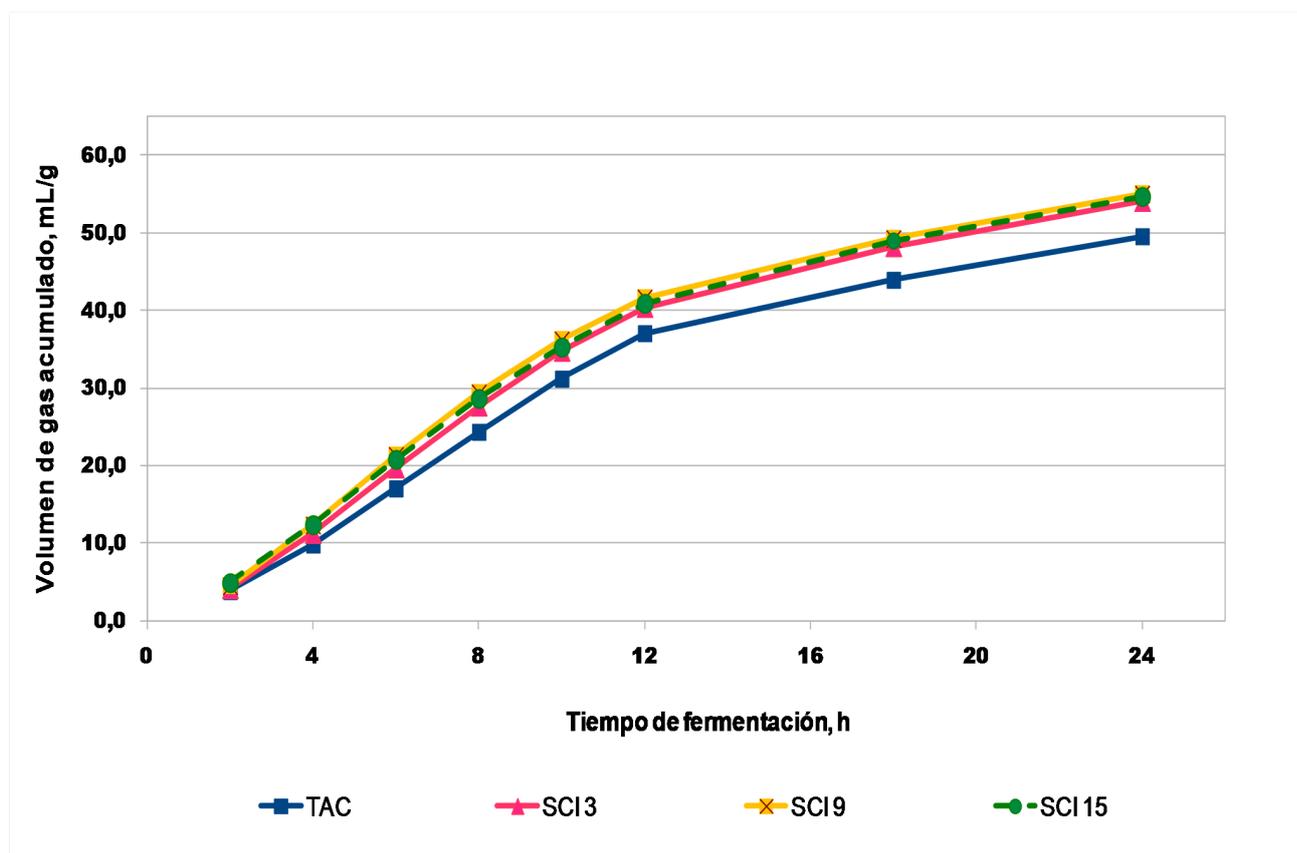


Figura 6. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de *Saccharomyces cerevisiae* inactivada en tres dosis.

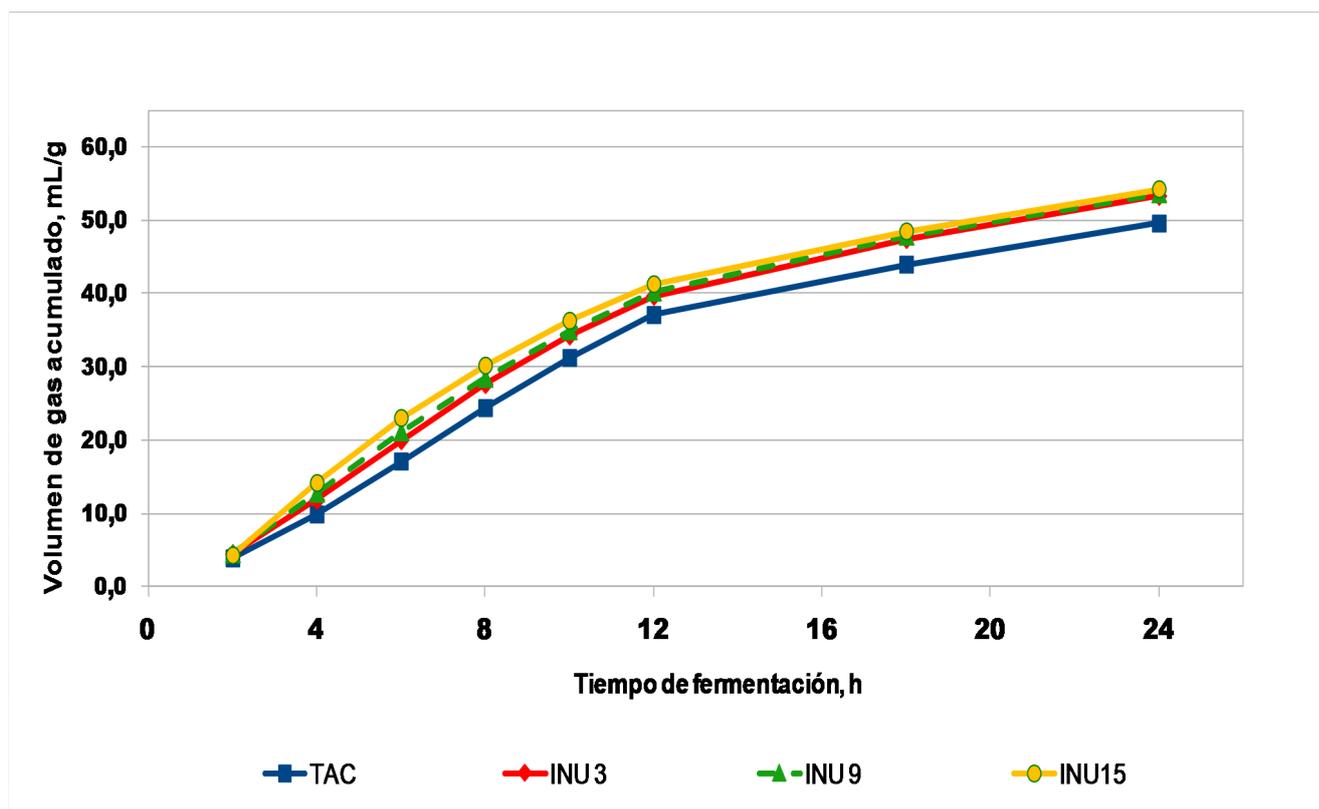


Figura 7. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de inulina en tres dosis.

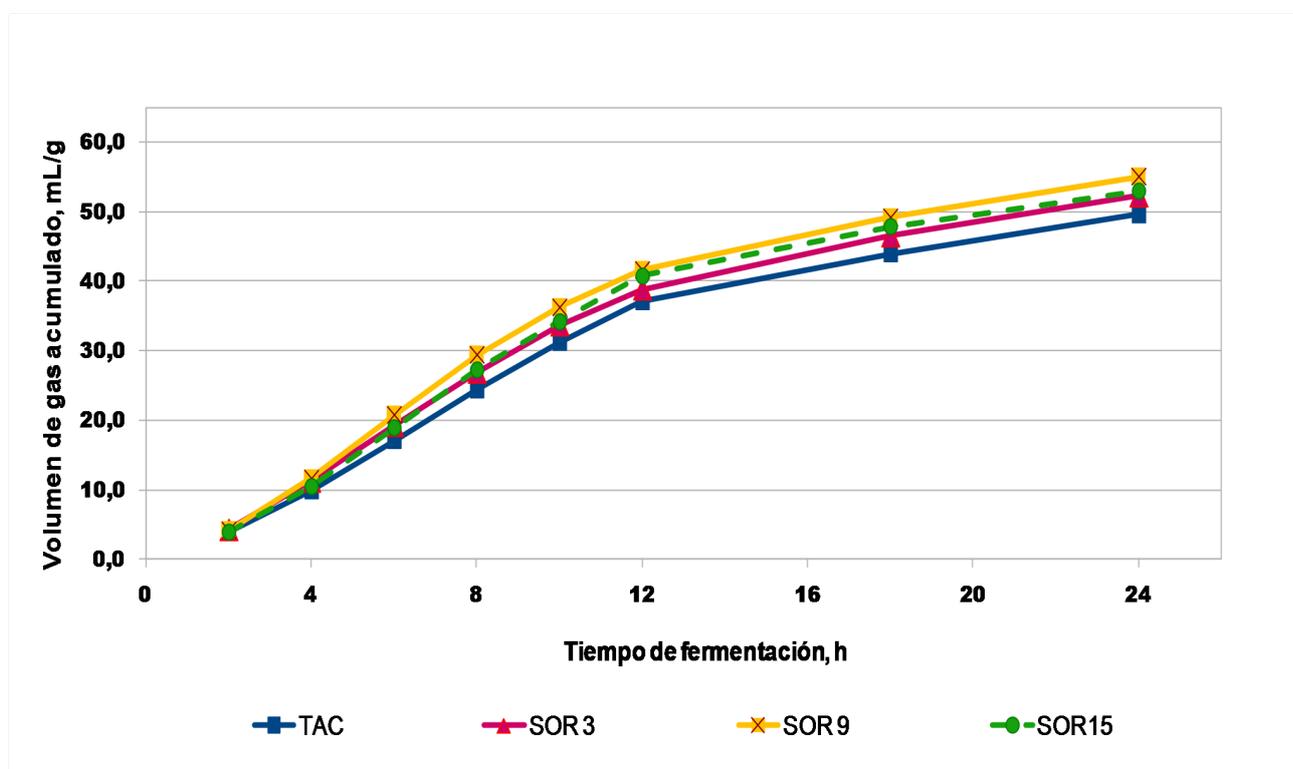


Figura 8. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de sorbitol en tres dosis.

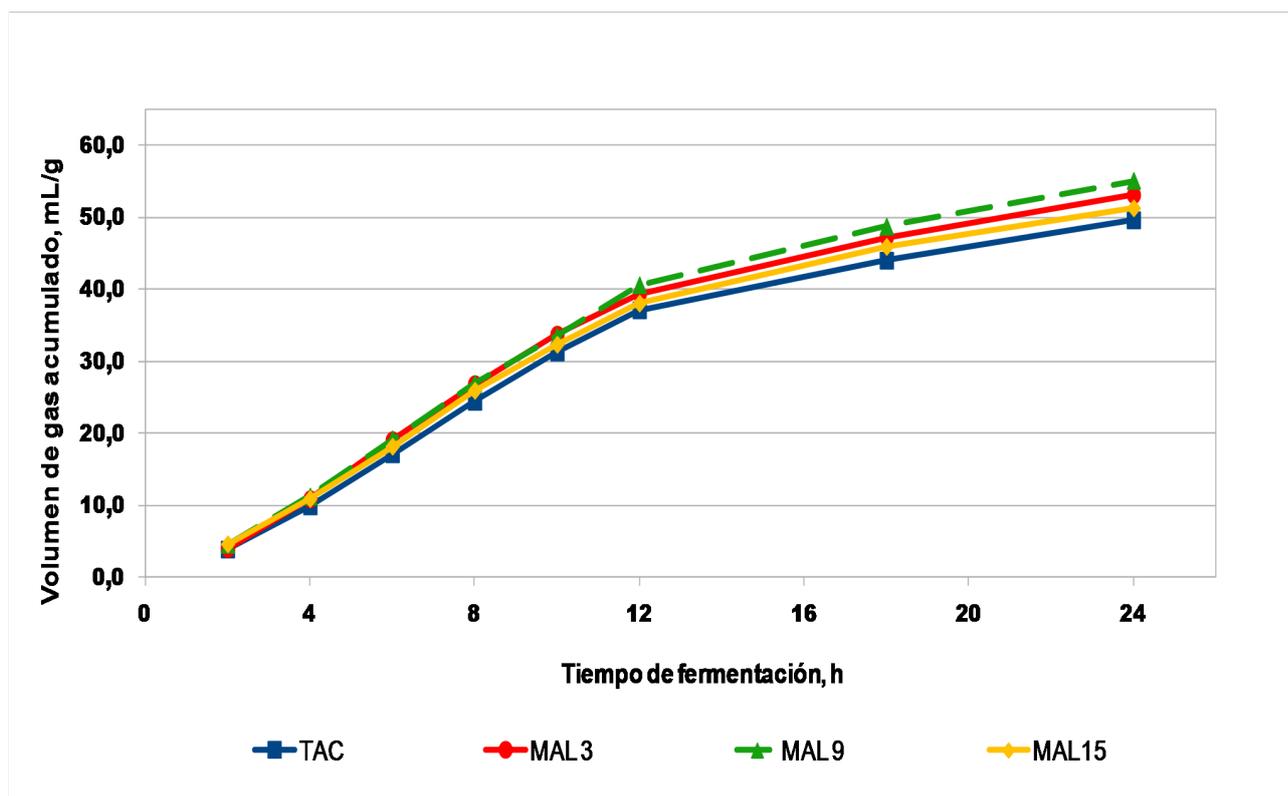


Figura 9. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de ácido málico en tres dosis.

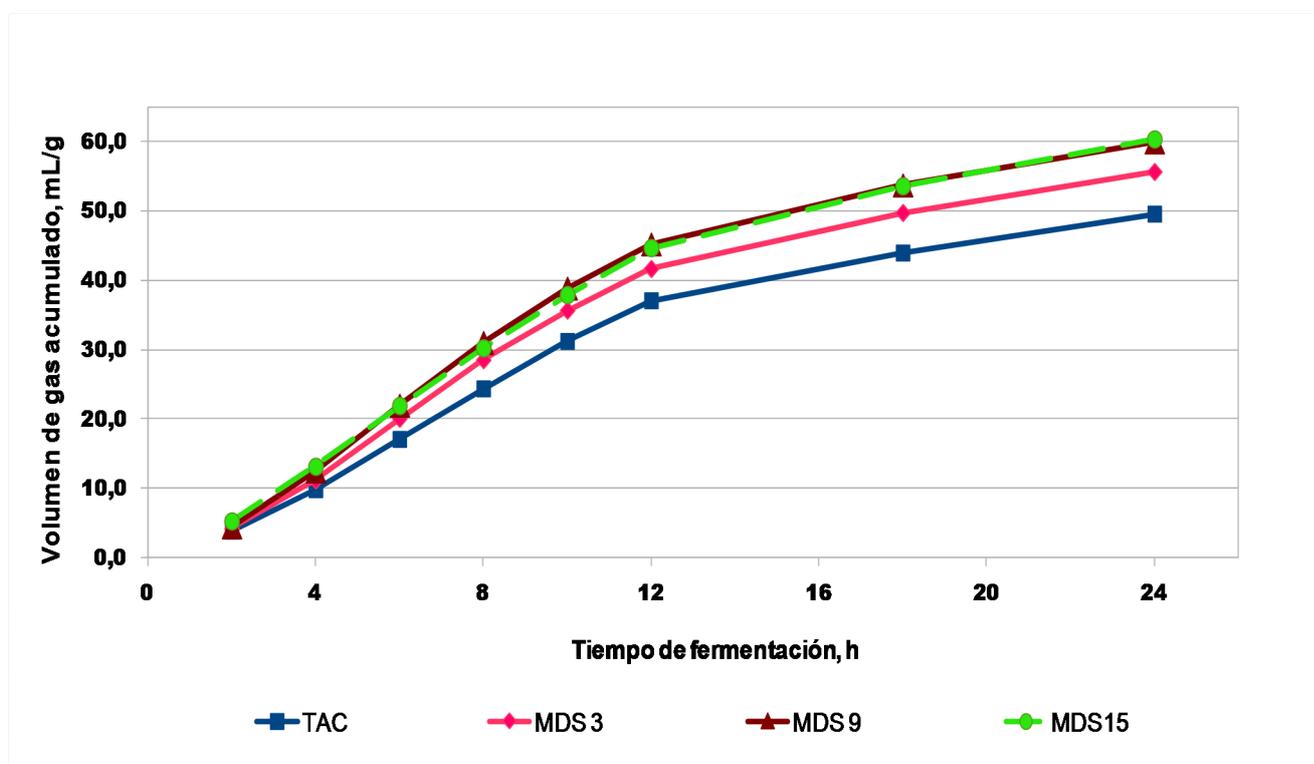


Figura 10. Evolución de la producción acumulada de gas en los fermentadores a lo largo del experimento para los tratamientos de malato de sodio en tres dosis.

En la figura 11 se observa el efecto de la adición de malato de sodio a las dosis de 9 y 15% sobre el pH y la producción acumulada de gas comparado con el control de acidosis. Estos tratamientos fueron seleccionados por ser los que presentaron los mejores resultados. El pH al comienzo del experimento cae más bruscamente y la diferencia entre los tratamientos de malato de sodio y el TAC va aumentando hasta las 12 horas, luego esta diferencia se mantiene constante. En cuanto a la producción acumulada de gas la diferencia entre los tratamientos de malato de sodio y el TAC aumenta a lo largo de todo el experimento.

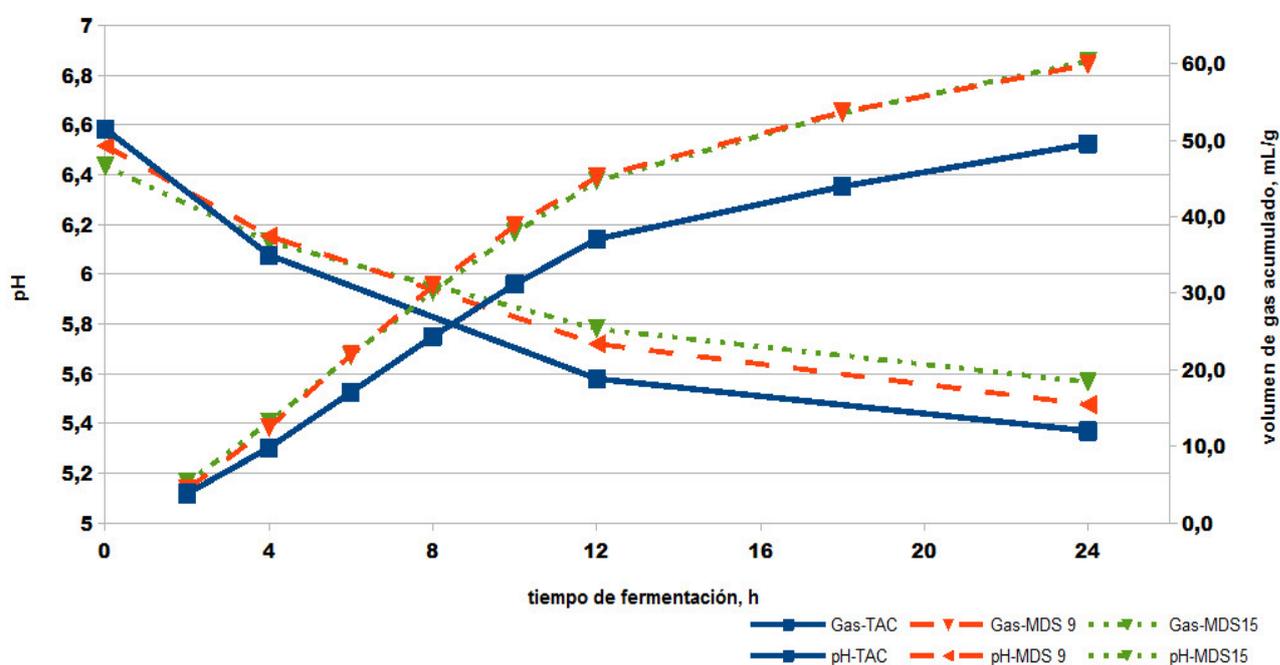


Figura 11. Comparación de la producción acumulada de gas y el pH de los tratamientos de malato de sodio al 9 y 15%.

DISCUSIÓN

Los valores de pH obtenidos en este experimento resultaron sustancialmente bajos si se comparan con los valores de pH ruminal que se pueden observar *in vivo* (Nocek y col., 2002; Erickson y col., 2003; Schwartzkopf-Genswein, 2003; Bevans y col., 2005). Esto se debería a que se trabajó en un sistema de fermentación simplificado en los que no se da ninguna de las instancias biológicas como absorción de AGV, ingreso de saliva, etc., y en los que se buscó el menor nivel de tamponamiento posible. De todas formas, el efecto modulador de algunos tratamientos experimentales se pudo apreciar debido a las diferencias estadísticamente significativas en el pH respecto al control que simuló acidosis ruminal.

Se pudo mostrar el efecto modulador de sustancias agregadas en condiciones experimentales que simulan la acidosis ruminal, a través de las variables pH y producción acumulada de gas.

Utilizando el pH como variable de respuesta se pudo ver que hubo tratamientos que se diferenciaron del tratamiento control de acidosis.

Las sustancias ensayadas presentaron algún efecto modulador en mayor o menor medida. De éstas, la que más se destacó por su mejor desempeño fue el malato de sodio a su mayor dosis. La dosis de 9% presentó un desempeño aceptable. Esto concuerda con lo observado por Martin y col. (1999) en un ensayo *in vivo*, en el que se suministró diferentes dosis de malato de sodio, observándose un aumento lineal del pH ruminal en los animales con las dosis más altas. En éste y en otros trabajos (Nisbet y Martin, 1990; Martin y Streeter, 1995; Callaway y Martin, 1996; Bach, 2002) se consignó que podría deberse a que el malato de sodio estimulaba selectivamente el desarrollo de microorganismos tales como *Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii*, los cuales podían utilizar el lactato como fuente de energía. A su vez el malato de sodio a las dosis de 9 y 15% fueron las que tuvieron mayor producción de gas. Esto concuerda con los hallazgos de Martin y Streeter, 1995 y Callaway y Martin, 1996, en los que en cultivos *in vitro* con adición de malato obtuvieron aumento en la producción total de gas y en la degradabilidad de la materia seca.

A pesar de los estudios *in vivo* con resultados auspiciosos de Montaña y col., 1999, realizados con ácido málico, lo obtenido por nosotros en los ensayos *in vitro* tuvieron resultados desalentadores, ya que si bien se hallaron diferencias en los valores de pH, los valores experimentales fueron significativamente inferiores al control. Estos valores de pH se podrían deber a la acidez propia de la sustancia testada.

Otro tratamiento que tuvo resultados interesantes fue el uso de las levaduras inactivadas ya que se diferenció del tratamiento control de acidosis en cuanto a las medidas de pH. Las dosis de 9 y 15% tuvieron resultados positivos tanto en la amortiguación de pH como en la producción de gas. Rossi y col. (2004) plantearon

que el efecto favorable sobre el pH podría deberse a la presencia de péptidos que forman parte de las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* algunos de los cuales tienen efecto estimulante de bacterias utilizadoras del lactato como *Megasphaera elsdenii*.

El desempeño del sorbitol y de la inulina no fue el esperado en todas las dosis testadas respecto a los resultados de pH. Öztürk (2008 y 2009) en un experimento *in vitro* (Rusitec) con inulina obtenida de diferentes plantas observó que el pH no fue significativamente afectado a ninguna dosis. Sin embargo, la producción total e individual de AGV aumentó considerablemente con la adición de la misma, siendo ésta una de las posibles explicaciones a los bajos valores de pH. En nuestro experimento al tratarse de un sistema cerrado esta acumulación de ácidos podría explicar el descenso de pH. Respecto a la producción de gas INU al 9 y 15% y SOR al 9% se diferenciaron del control en forma positiva sugiriendo un posible efecto modulador de la biota en cuanto al aprovechamiento del sustrato. Los únicos trabajos que reportan el uso de sorbitol *in vivo* en rumiantes mencionan incremento de la eficiencia productiva pero no mencionan efectos sobre el pH ruminal ni sobre la producción de gas (Fontenot y Huchette, 1993).

En este ensayo la producción de gas acumulada como única variable no permite discriminar los mejores tratamientos. A pesar de que el MDS al 9 y 15% fueron los que tuvieron mejores resultados en cuanto al pH y a su vez la mayor producción de gas (ver figura 11), encontramos otros tratamientos como INU al 9 y 15% y SOR al 9% que presentaron una gran producción de gas, pero no tuvieron buenos resultados en cuanto al pH.

Russell y col. (1979), Shi y Weimer (1992) y Thurston y col. (1993) en diferentes experimentos *in vitro*, observaron que las bacterias celulolíticas presentaron inhibición del crecimiento a pH inferior a 5,9. Sin embargo, las bacterias continuaron fermentando los sustratos y acidificando el medio a una tasa similar a la observada antes de que el crecimiento cesara. Esto podría concordar con lo ocurrido en nuestro ensayo donde a valores de pH bajos se observó que la producción de gas siguió aumentando.

Esto podría ser explicado en parte por la actividad de microorganismos como *Ruminococcus albus*, que no sería capaz de desarrollarse a pH inferior a 6,0, pero su capacidad para metabolizar los hidratos de carbono en condiciones ácidas puede permitir que sobreviva a descensos transitorios en el pH ruminal, lo que podría justificar sus números relativamente altos en dietas concentradas (Thurston y col., 1993).

Otra posible explicación podría deberse a que la propia fermentación microbiana del rumen da lugar como productos finales AGV, gases (CO₂ y CH₄), calor y energía bajo forma de ATP, por lo que es la propia fermentación la principal responsable de la producción gaseosa del rumen (Calsamiglia y Ferret, 2002). A su vez la reducción de la concentración de ácido láctico resulta en un incremento en el pH ruminal que

favorece el crecimiento de las bacterias fibrolíticas que resulta en un incremento en la digestión de la fibra y en la producción de AGV (Calsamiglia y col., 2005).

CONCLUSIONES

Se comprobó que algunos tratamientos fueron exitosos en la amortiguación de la caída del pH en una situación de simulación de acidosis ruminal *in vitro* con un método estático de corta duración (24 horas). 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.

Los tratamientos que tuvieron mejor desempeño fueron malato de sodio al 15 y 9% y *Saccharomyces cerevisiae* inactivada al 15 y 9% (en orden descendente). Trasladar esto linealmente a una situación *in vivo* probablemente debiera requerir de ciertos ajustes por lo que no se podría recomendar estas dosis en animales como preventivo de acidosis ruminal.

La dinámica en este corto tiempo sugiere que probablemente se requerirían dosificaciones cada aproximadamente 12 a 24 horas para mantener su efecto.

Tanto la medición de la producción de gas como de pH resultaron como apropiadas variables de respuesta para este tipo de experimento. No obstante la primera no resulta totalmente selectiva para discriminar los mejores tratamientos. El pH es la variable directamente relacionada con la acidosis y es por lo tanto la más adecuada para realizar dicha discriminación.

Estos resultados indicarían que el malato de sodio y *Saccharomyces cerevisiae* inactivada actúan estimulando ciertos microorganismos de la biota ruminal capaces de utilizar el lactato, limitando así la acumulación de ácidos en exceso (acción prebiótica). Esto debería ser verificado en experimentos *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adams, D. C., Galyean, M. L., Kiesling, H. E., Wallace, J. D., Finkner, M. D. (1981). Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.* 53:780-789.
- 2) Aldrovandi, A., Britos, A., Paz, S., Molina, A., Cajarville, C., Zunino, P. (2009). Prebiotic performance in the prevention of acidosis of different substances using the “gas-in-vitro” methodology in ruminal acidosis-like condition. *J. Anim. Sci.* 87:289.
- 3) Aldrovandi, A., Molina, A., Paz, S., Cajarville, C., Zunino, P. (2009). Aproximación a un modelo experimental *in vitro* para estudiar la acidosis ruminal subaguda. XXXVII Jornadas de Buiatría, Paysandú, Centro Médico Veterinario de Paysandú, Uruguay. 166-168.
- 4) Antúnez, P. (2012). El País. Importadores de UE priorizan carne de alta calidad. El País digital. Viernes 26 de Octubre del 2012, Montevideo, Uruguay. Disponible en <http://historico.elpais.com.uy/121026/pecono-671944/economia/impotadores-de-ue-priorizan-cuota-de-carne-de-alta-calidad/> Fecha de consulta: 16/3/2013.
- 5) Bach, A. (2002). Trastornos ruminales en el Ganado lechero: un enfoque práctico. VIII Curso de especialización FEDNA, Barcelona, España, 119-139.
- 6) Bauchart, D., Aurousseau, B., Auclair, E., Labarre, A. (1985). Addition of sorbitol to a milk substitute for veal calves. Effects on plasma, liver and muscle lipids. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 25(2): 411-425.
- 7) Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Rode, L. M. (2003). Effects of particle size of alfalfa based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 86:630-643.
- 8) 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.
- 9) Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Chiquette, J., Chouinard, P. Y. (2007). Effects of Essential Oils on Digestion, Ruminal Fermentation, Rumen Microbial Populations, Milk Production, and Milk Composition in Dairy Cows Fed Alfalfa Silage or Corn Silage. *J. Dairy Sci.* 90(2):886-97.
- 10) Beuvinck, J.M., 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. Technol.* 37, 505–509
- 11) Bevans, D. W., Beauchemin, K. A., Schwartzkopf-Genswein, K. S., McKinnon, J. J., McAllister, T. A. (2005). Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 83:1116–1132.
- 12) Blaut, M. (2002). Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr* 41 [Suppl 1]: I/11–I/16.
- 13) Blümmel, M., Ørskov, E.R. (1993). Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40:109–119.
- 14) Bramley, E., Lean, I. J., Fulkerson, W. J., Steverson, M. A., Rabiee, A. R., Costa, N. D. (2006). The Definition of Acidosis in Dairy Herds Predominantly Fed on Pasture and Concentrates. *J. Dairy Sci.* 91:308–321.

- 15) Callaway, T. 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. 82(E. Suppl.):E93–E99.
- 16) Callaway, T. R., Martin, S. A. (1996). Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. J. Anim. Sci., 74:1982-1989.
- 17) Calsamiglia, S., Castillejos, L., Busquet, M. (2005). Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. XXI Curso de especialización FEDNA, Madrid, España, p. 161-185.
- 18) Calsamiglia, S., Ferret, A. (2002). Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: Acidosis y meteorismo. XVIII Curso de especialización FEDNA, Barcelona, España, p. 97-115.
- 19) Carro, M.D., Ranilla, M.J., Tejido, M.L. (2005) Using an in vitro gas production technique to examine feed additives: Effects of correcting values for different blanks. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124, 173-184.
- 20) Castro, M., Rodriguez, F. (2005). Levaduras: Probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. Revista Corpoica vol. 6 numero 1 página 16-38.
- 21) Chaudhry, A.S.; Mohamed,R. (2012). Fresh or frozen rumen contents from slaughtered cattle to estimate in vitro degradation of two contrasting feeds. Czech J. Anim. Sci., 57(6): 265–273.
- 22) 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.
- 23) Church, C. D. (1993). El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, Acribia, España. 641 p.
- 24) Collins, M. D., Gibson, G. R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am J Clin Nutr 69(suppl):1052S–7S.
- 25) Colombatto, D., Mould, F. L., Bhat, M. K., Owen, E. (2007). Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the *in vitro* ruminal fermentation of alfalfa stems. Anim. Feed. Sci. Technol. 137:150-162.
- 26) Cone, J.W., van Gelder, A.H., Visscher, G.J.W., Oudshoorn, L. (1996). Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. Anim. Feed Sci. Technol. 61:113–128.
- 27) Counotte, G. H. M., Prins, R. A., Janssen, R. H. A. M., DeBie M. J. A. (1981). Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle, Appl. Environ. Microbiol. 42:649–655.
- 28) Czerkawsky, J. W., Breckenridg, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). Br. J. Nutr. 38: 371-384.
- 29) Davies, Z.S., Mason, D., Brooks, A.E., Griffith, 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 grass silage. Anim. Feed Sci. Technol. 83:205–221.
- 30) de Vaux, A., Morrison, M., Hutkins, R. W. (2002). Displacement of *Escherichia coli* O157:H7 from Rumen Medium Containing Prebiotic Sugars. Appl. Environ. Microbiol. 68:519–524.
- 31) Duggan, C., Gannon, J., Walker, W. A. (2002). Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. Am J. Clin. Nutr.; 75:789–808.
- 32) Erickson, G. E., Milton, C. T., Fanning, K. C., Cooper, R. J., Swingle, R. S., Parrott, J. C., Vogel, G., Klopfenstein, T. J. (2003). Interaction between bunk management and monensin concentration on finishing performance, feeding

- behavior, and ruminal metabolism during an acidosis challenge with feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2869–2879.
- 33) Figueroa, J. L., Chi, E. E., Cervantes, M., Dominguez, I. A. (2006). Alimentos funcionales para cerdos al destete. *Vet. Méx.*, 37(1):117-136.
 - 34) Fondevila, M., Pérez-Espes, B. (2008). A new in vitro system to study the effect of liquid phase turnover and pH on microbial fermentation of concentrate diets for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144:196–211.
 - 35) Fontenot, J. P., Huchette, H. M. (1993). Feeding sorbitol alone or in combination with monensin to finishing cattle. *J Anim Sci.* 71:545-551.
 - 36) Fukushima, R.S., Weimer, P.J., Kunz, D.A. (2003). Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. *Bras. J. Microbiol.* 34:22–26.
 - 37) Garrett, E. F., Pereira, M. N., Nordlund, K. V., Armentano, L. E., Goodger, W. J., Oetzel, G. R. (1999). Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 82:1170-1178.
 - 38) Getachew, G., DePeters, E. J., Robinson, P. H., Fadel, J. G. (2005). Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 547-559.
 - 39) Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1412.
 - 40) Giraldo, L. A., Gutiérrez, L. A., Rúa, C. (2007). Comparación de dos técnicas in vitro e in situ para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. *Rev. Col. Cienc. Pec;* 20:269-279.
 - 41) Gosselink, J. M. J., Dulphy, J. P., Poncet, C., Tamminga, S., Cone, J. W. (2004). A comparison of in situ and in vitro methods to estimate in vivo fermentable organic matter of forages in ruminants. *NJAS Wageningen Journal of Life Sciences.* 52(1):29-45.
 - 42) Gozho, G. N., Plaizier, J. C., Krause, D. O., Kennedy, A. D., Wittemberg, K. M. (2005). Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 88:1399-1403.
 - 43) Grant, R. J., Mertens, D. R. (1992). Influence of Buffer pH and Raw Corn Starch Addition on In Vitro Fiber Digestion Kinetics. *J. Dairy Sci.* 75(10):2762-2768.
 - 44) Hagg, F. M., Erasmus, L. J., Henning, P. H., Coertze, R. J. (2010). The effect of a direct fed microbial (*Megasphaera elsdenii*) on the productivity and health of Holstein cows. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 40(2):101-112.
 - 45) Hagg, F. M. (2007). The effect of *Megasphaera elsdenii*, a probiotic, on the productivity and health of Holstein cows. Tesis de Maestría. Universidad de Pretoria. 71 p.
 - 46) Henning, P. (2007). Acidosis in High-Producing Ruminants – Myth or Menace? Disponible en <http://en.engormix.com/MA-dairy-cattle/articles/acidosis-highproducing-ruminants-myth-t529/p0.htm>. Fecha de consulta: 31/7/2012.
 - 47) Hungate, R.E. (1966). *The Rumen and its Microbes*. New York, Academic Press, 533 p.
 - 48) Instituto Nacional de Carnes-Dirección de información y análisis económico (2012). Informe estadístico, año agrícola julio 2011 a junio 2012. INAC, Montevideo, Uruguay. Disponible en http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/7713/1/agricola_con_tapa_frente_y_dorso.pdf. Fecha de consulta: 15/10/2012.
 - 49) Jacobsen, C. N., Rosenfeldt Nelsen, V., Hayford, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandstro, B., Tvede, M., Jakobsen, J.

- (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11):4949–4956.
- 50) Judkins, M. B., and R. H. Stobart (1988). Influence of two levels of enzyme preparation on ruminal fermentation, particulate and fluid passage and cell wall digestion in wether lambs consuming either a 10% or 25% grain diet. *J. Anim. Sci.* 66:1010-1015.
- 51) Kohn, R. A., Dunlap, T. F. (1998). Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro. *J. Anim. Sci.* 1998. 76:1702-1709.
- 52) Kozloski, G. V., Lima, L. D., Cadorin Jr, R. L., Bonnacarrere Sanchez, L. M., Senger, C. C. D., Fiorentini, G., Harter, C. J. (2007). Microbial colonization and degradation of forage samples incubated in vitro at different initial pH. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141:356–367.
- 53) Krause, K. M., Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:215-236.
- 54) Krehbiel, C. R., Britton, R. A., Harmon, D. L., Wester, T. J., Stock, R. A. (1995). The Effects of Ruminal Acidosis on Volatile Fatty Acid Absorption and Plasma Activities of Pancreatic Enzymes in Lambs. *J. Anim. Sci.* 73:3111–3121.
- 55) Krizsan, S. J., Broderick, G. A., Muck, R. E., Promkot, C., Colombini, S., Randby, A. T. (2007). Effect of Alfalfa Silage Storage Structure and Roasting Corn on Production and Ruminal Metabolism of Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90(10):4793-804.
- 56) Kung, L. Jr., Hession, A. O. (1995). Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*, *J. Anim. Sci.* 73: 250–256.
- 57) Liong, M.T., Shah, N.P. (2005a) Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. *J. App. Microbiol.*, 99:783-793.
- 58) 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.
- 59) Lipke, P. N., Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180:3735-3740.
- 60) Marteau, P., Seksik, P. (2004) Tolerance of Probiotics and Prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* 38(6 Suppl): S67-S69.
- 61) Marteau, P., Seksik, P., Lepage, P., Doré, J. (2004). Cellular and Physiological Effects of Probiotics and Prebiotics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4:889-896.
- 62) Martin, S. A. (1998). Manipulation of Ruminal Fermentation with Organic Acids: A Review. *J. Anim. Sci.* 76:3123–3132.
- 63) Martin, S. A., Nisbet, D. J. (1990). Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.*, 68:2142-2149.
- 64) Martin, S. A., Streeter, M. N. (1995). Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Anim. Sci.* 73: 2141-2145.
- 65) Martin, S. A., Streeter, M. N., Nisbet, D. J., Hill, G. M., Williams, S. E. (1999). Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 77: 1008-1015.
- 66) 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.

- 67) McBee, R. H. (1953). Manometric Method for the Evaluation of Microbial Activity of Rumen with Application to Utilization of Cellulose and Hemicelluloses. *Appl. Microbiol.* 1:106-110.
- 68) McGinn, S.M.; Beauchemin, K.A.; Coates, T.; Colombatto, D. (2004) Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82:3346–3356.
- 69) 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 feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 93: 217–222.
- 70) Middelbos, I. S., Godoy, M. R., Fastinger, N. D., Fahey, G. C. (2007). A dose-response evaluation of spray-dries yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices and fecal microbial populations. *J. Anim. Sci* 85:3022-3032.
- 71) Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca-DIEA (2013). Estadísticas del sector lácteo 2011. Serie de trabajos especiales n° 309. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,5,104,O,S,0,5951%3bS%3b1%3b106> Fecha de consulta: 7/4/2013.
- 72) Mohamed, R., Chaudry, A.S., Rowlinson, P. (2002). Fresh or frozen rumen contents as sources of inocula to estimate *in vitro* degradation of ruminant feeds. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, 164.
- 73) Montañó, M. F., Chai, W., Zinn-Ware, T. E., Zinn, R. A. (1999). Influence of malic acid supplementation on ruminal pH, lactic acid utilization, and digestive function in steers fed high-concentrate finishing diets. *J. Anim. Sci.* 77: 780-784.
- 74) Mould, F. L., Kliem, K. E., Morgan, R., Mauricio, R. M. (2005). *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124: 31–50.
- 75) Nagaraja, T. G., Lechtenberg, K. F. (2007). Acidosis in Feedlot Cattle. *Vet. Clin. Food Anim.* 23:333–350.
- 76) Nagaraja, T. G., Titgemeyert, E. C. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90(E. Suppl.):E17–E38.
- 77) Newbold, C. J., Wallace, R. J., Chen, X. B. y McIntosh, F. M. (1995). Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73:1811-1818.
- 78) Newbold, C.J., Wallace, R.J. y McIntosh, F.M. (1996). Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* 76: 249-261.
- 79) 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.
- 80) Nisbet, D. J., Martin, S. A. (1991). Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.*, 69:4628-4633.
- 81) Nisbet, D. J., Martin, S. A. (1993). Effects of Fumarate, L-Malate and an *Aspergillus oryzae* Fermentation extract on D-Lactate Utilization by the Ruminal Bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Current Microbiology* Vol. 26, 133-136.
- 82) Nocek, J. E. (1997). Bovine Acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005-1028.
- 83) Nocek, J. E., Allman, J. G., Kautz, W. P. (2002). Evaluation of an Indwelling Ruminal Probe Methodology and Effect of Grain Level on Diurnal pH Variation in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 85:422–428.

- 84) Nocek, J. E., Kautz, W. P. (2006). Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89: 260-266.
- 85) Öztürk, H. (2008). Effects of inulin on rumen metabolism *in vitro*. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 55, 79-82.
- 86) Öztürk, H. (2009). Effects of chicory inulin on ruminal fermentation *in vitro*. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 56, 171-175.
- 87) Palmer, M. J. A., Jessop, N. S., Fawcett, R., Illius, A. W. (2005). Interference of indirect gas produced by grass silage fermentation acids in an *in vitro* gas production technique. *Animal Feed Science and Technology* 123–124:185–196.
- 88) Pell, A.N., Schofield, P. (1993). Computerised monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 76:1063–1073.
- 89) Ried, G. (1999). The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9):3763–3766.
- 90) Roberfroid, M. B. (2001). Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *Am J Clin Nutr*; 73(suppl):406S–9S.
- 91) Rossi, F., Di Luccia, A., Vincent, D., Cocconcelli, P. S. (2004). Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. *Anim. Res.* 53:177–186.
- 92) Russell, J. B., Sharp, W. M., Baldwin, R. L. (1979). The effect of pH on maximum bacterial growth rate and its possible role as a determinant of bacterial competition in the rumen. *J. Anim. Sci.* 48:251-255.
- 93) Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., Givens, D. I. (2005). *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124:9–30.
- 94) Rymer, C., Williams, B. A., Brooks, A. E., Davies, D. R., Givens, D. I. (2005). Inter-laboratory variation of *in vitro* cumulative gas production profiles of feeds using manual and automated methods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 225-241.
- 95) 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.
- 96) Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Meschy, F. (2006). Le contrôle de l'acidose ruminale latente. *INRA Prod. Anim.*, 19(2):69-78.
- 97) Schwartzkopf-Genswein, K. S., Beauchemin, K. A., Gibb, D. J., Crews, D. H., Hickman, D. D., Streeter, M., McAllister, T. A. (2003). Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):E149–E158.
- 98) Senger, C. C. D., Frenzel, P. R., Bonnacarrère, L. M., Kozloski, G. V., Kist, G. P., de Lima, L. D., Perez Netto, D. (2007). Comparação entre os métodos químico, *in situ* e *in vitro* para estimativa do valor nutritivo de silagens de milho. *Ciência Rural*, Santa Maria, 37(3):835-840.
- 99) Shi, Y., Weimer, P. J. (1992). Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavofaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2583-2591.
- 100) Smith, P. S. (2008). Dietary fibre requirements of feedlot lambs. Tesis de Maestría. University of the free state Bloemfontein. 59 p.
- 101) Spring, P., Wenk, C., Dawson, K. A., Newman, K. E. (2000). The Effects of Dietary Mannanligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric Bacteria in the Ceca of Salmonella-Challenged Broiler Chicks. *Poultry Science* 79:205–211.

- 102) Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Healy, H. P., Dawson, K. A., Merchen, N. R., Fahey, G. C. (2002). Supplemental fructooligosaccharides and mannanooligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. *J. Nutr.* 132:980-989.
- 103) Tebot, I. (2008). Efecto de los suplementos ricos en energía sobre la función ruminal y el metabolismo del nitrógeno en ovinos alimentados con forraje fresco. Tesis de maestría. Universidad de la República, Uruguay. 65 p.
- 104) 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.
- 105) Thivend, P., Debarre, M., Lafaivre, J., Toullec, R. (1984). Influence of sorbitol on biliary secretion in the preruminant calf. *Can. J. Anim. Sci.* 64(Suppl.):102.
- 106) Thurston, B., Dawson, K. A., Strobel, H. J. (1993). Cellobiose versus glucose utilization by the ruminal bacterium *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2631-2637.
- 107) Tilley, J.M.A., Terry, R.A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104–111.
- 108) 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.
- 109) Udén, P., Van Soest, P. J. (1984). Investigations of de in situ bag technique and comparison of the fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. *J. Anim Sci.*, 58(1):213-221.
- 110) Vanzant, E. S., Cochran, R. C., Titgemeyer, E. C. (1998). Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.*, 76:2717-2729.
- 111) Van Loo, A. (2007). How chicory fructans contribute to zootechnical performance and well. Being in Livestock and companion animals. *J. Nutr.* 137: 2594. S – 2597 S.
- 112) Wiedmeier, R. D., M. J. Arambel, and J. L. Walters (1987). Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063-2068.
- 113) Wilkins, J. (1974). Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Appl. Microbiol.* 27:135–140.
- 114) Williams, B. A., Bosch, M. W., Awati, A., Konstantinov, S. R., Smidt, H., Akkerman, A. D. L., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S. (2005). In vitro assessment of gastrointestinal tract (GIT) fermentation in pigs: Fermentable substrates and microbial activity. *Anim. Res.* 54: 191-201.
- 115) Williams, P. E., Tait, C. A., Innes, G. M., Newbold, C. J. (1991). Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69:3016-3026.
- 116) 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. Dairy Sci.*, 89:217-228.