



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

ADAPTACIÓN DE SISTEMAS DE FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* PARA EVALUAR EL EFECTO MODULADOR DE CUATRO POTENCIALES PREBIÓTICOS EN CONDICIONES DE ACIDOSIS

Ariel Aldrovandi

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2015**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ADAPTACIÓN DE SISTEMAS DE FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO*
PARA EVALUAR EL EFECTO MODULADOR DE CUATRO POTENCIALES
PREBIÓTICOS EN CONDICIONES DE ACIDOSIS**

Ariel Aldrovandi

Pablo Zunino
Director de Tesis

Cecilia Cajarville
Co-director

2015

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

**María de Jesús Marichal; MSc
Departamento de Producción Animal y Pasturas
Facultad de Agronomía
Universidad de la República**

**Martín Fraga; MSc, PhD
Plataforma de Salud Animal, Microbiología
Instituto de Investigaciones Agropecuarias**

**Darío Hirigoyen; MSc
Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República**

2015

EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL
ACTA DE DEFENSA DE TESIS

En esta hoja va el Informe del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

A mis tutores, por su paciencia.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	2
Ambiente ruminal.....	2
Acidosis ruminal.....	3
Estrategias no antibióticas para incidir en el metabolismo microbiano ruminal.....	6
Inhibidores yodados.....	6
Uso de compuestos con actividad tampón o antiácida.....	7
Extractos de especias (aceites esenciales).....	7
Probióticos y prebióticos.....	7
Sustancias que podrían tener efecto prebiótico en rumiantes.....	8
Levaduras inactivadas.....	8
Ácido málico y malato.....	9
Inulina.....	9
Sorbitol.....	9
Métodos de fermentación <i>in vitro</i> utilizados para evaluar la función digestiva animal.....	9
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	11
Hipótesis.....	11
Objetivos.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Descripción general del sistema experimental usado.....	13
Diseños experimentales.....	17
Experimento 1.....	17
Experimento 2.....	18
Experimento 3.....	20
Experimento 4.....	22
Experimento 5.....	23
Análisis estadísticos.....	25
RESULTADOS.....	26
Experimento 1.....	26
Experimento 2.....	29
Experimento 3.....	35
Experimento 4.....	39
Estudio de la variación de pH con tres diferentes salivas artificiales.....	39
Efecto modulador de cuatro aditivos sobre el descenso del pH.....	41
Experimento 5.....	44
Producción de gas.....	45
Evolución del pH.....	50
Producción de NH ₃	55
Producción de AGV.....	55
DISCUSIÓN.....	58
Medición de la producción de gas.....	58
Medición del pH, de los AGV y del NH ₃	61

Salivas artificiales como objeto de estudio.....	66
Modelos matemáticos estudiados mediante regresiones no lineales.....	67
En síntesis.....	68
CONCLUSIONES GENERALES.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

RESUMEN

Los animales de alta producción son sometidos permanentemente a un stress que los mantiene al borde de ciertas patologías que resultan difíciles de manejar/controlar y se presentan en forma insidiosa con una reducción en la producción y pérdidas económicas importantes. Entre ellas se encuentra la Acidosis Ruminal Subaguda, que se caracteriza por una disminución del pH ruminal sostenida en el tiempo, haciendo que los procesos biológicos que normalmente tienen lugar en el ecosistema ruminal sean distorsionados, con la consecuente disminución de la síntesis de nutrientes y su absorción.

Dada la importancia económica de la acidosis ruminal y de las exigencias de los consumidores se justifica la realización de investigación para estudiarla y evaluar diferentes estrategias no antibióticas para controlarla. Entre tales estrategias está el uso de prebióticos, agregados en la ingesta de los animales para actuar en el ecosistema ruminal moderando el descenso del pH a través del estímulo selectivo de microorganismos ruminales.

En la actualidad hay diversos métodos para estudiar el ecosistema ruminal, entre los que se destacan los métodos *in vitro* y en particular el denominado gas-*in vitro* por su versatilidad y por ser razonablemente económico a pesar de las obvias limitaciones que puede presentar.

Suponiendo que el método de producción de gas *in vitro* podría resultar útil, en una situación en la que se simulara una acidosis ruminal, para estudiar el posible efecto modulador de los siguientes aditivos: levadura inactivada, inulina, sorbitol, ácido málico y malato de sodio sobre la biota ruminal, se realizaron cinco experimentos para comprobarlo. Para producir la acidosis simulada se prepararon sistemas de fermentación en frascos de vidrio de 125 mL precintados, con una mezcla deshidratada de cebada y pasturas cosechadas en estado vegetativo. Además se agregaron en algunos de ellos, los aditivos mencionados en tres dosis (3, 9 y 15%) respecto al total del sustrato (500 mg). También se incubaron frascos con líquido ruminal tamponado como control de la vitalidad del mismo. Se utilizaron tratamientos triplicados para cada tiempo de medida de pH. Fue necesario ensayar diferentes salivas artificiales para visualizar mejor las variaciones de pH.

Se registraron: producción de gas, el pH, los ácidos grasos volátiles a las 24 h, el NH_3 , midiéndose la primera en los experimentos 1, 3 y 5, el pH en los experimentos 2, 3, 4 y 5 y las dos últimas sólo en el último. Se analizaron los valores obtenidos y se estudiaron modelos matemáticos comprobados mediante regresiones no lineales.

El malato de sodio resultó el aditivo que mostró mayores diferencias en las variables medidas respecto al control de acidosis ruminal simulada. Los otros tratamientos resultaron más inconstantes, dando resultados no concluyentes.

Los modelos utilizados para estudiar los datos experimentales mostraron similitudes con algunos usados por otros autores. El modelo empleado para el pH aportó parámetros que podrían resultar de utilidad en futuros estudios.

Para las condiciones aplicadas en estos cinco experimentos fue necesario reducir el nivel de tamponamiento, resultó más útil como medida de los efectos moderadores de la acidez la variable pH que la producción de gas.

Harían falta más estudios *in vitro* e *in vivo* antes de poder recomendar el uso de alguna de estas sustancias para prevenir la acidosis ruminal.

SUMMARY

High production animals are constantly subjected to stress that keeps the edge of some diseases that are difficult to control and insidiously present with a reduction in production and significant economical losses. Among them is the Subacute Ruminant Acidosis, characterized by a maintained decrease in ruminal pH, negatively affecting the normal biological activity in the ruminal ecosystem, with the consequent reduction in the synthesis of nutrients and their absorption.

Because of the economic importance of ruminal acidosis and the demands of consumers of several markets, studying and evaluating different non-antibiotic strategies to control it, is justified. Among these strategies is the use of prebiotics, substances added in the intake of the animals could act in rumen ecosystem to moderate the drop in pH through selective stimulation of rumen microorganisms.

At present a variety of methods to study the ruminal ecosystem can be expected, among which highlights *in vitro* methods and in particular the so-called *in vitro*-gas for its versatility and for being reasonably economical despite the obvious limitations that may have.

Assuming that *in vitro*-gas method could be useful in a situation of simulated ruminal acidosis, in order to study the possible modulating effect of inactivated yeast, inulin, sorbitol, malic acid and sodium malate on ruminal biota, five experiments were conducted to test it. To mimic ruminal acidosis, fermentation systems were prepared in 125 mL sealed glass vials, with a dried mixture of barley and pastures harvested in vegetative stage. In some of them were added, the mentioned additives in three doses (3, 9 and 15%) to total substrate (500 mg). Vials with buffered rumen fluid as control thereof vitality were also incubated. Triplicate treatments were used. It was required to make a complete set of experimental units (design x 3) for each time when pH was measured. In order to obtain better visualization of pH variations, several changes in artificial saliva composition were made.

Gas production, pH, volatile fatty acids at 24 h, NH₃ were recorded. Gas production was measured in experiments 1, 3 and 5, while pH was measured in the experiments 2, 3, 4 and 5, but the last two variables only was recorded in the latter one.

Obtained values were analyzed by ANOVA ($\alpha=0,05$) and data was adjusted to mathematical models using nonlinear regression.

Sodium malate was the additive showed major differences to control treatment (simulated ruminal acidosis) in measured variables. The other treatments were more ambiguous, giving inconclusive results.

Models used to study the experimental data showed similarities with some used by other authors. The model employed for pH provided parameters that could be useful in further studies.

In these five experiments were necessary to reduce buffering, and pH proved been more effective as a measure of moderating effects on acidity than gas production.

It would take more studies *in vitro* and *in vivo* before recommending the use of any of these substances to prevent ruminal acidosis.

INTRODUCCIÓN

La acidosis ruminal subaguda (SARA por su sigla en inglés) es una enfermedad trascendente que compromete la economía del productor y la salud y el bienestar de los animales de alta producción cárnica y lechera (Kleen et al, 2003; Gozho et al, 2005; Martin et al, 2006; Enemark, 2009).

Como todo padecimiento subclínico, SARA tiene una presentación insidiosa y para combatirla es conveniente actuar en forma preventiva.

Es cada vez más importante aplicar terapias que no dejen residuos en los tejidos y secreciones de los animales (alimentos de origen animal). En este contexto, el uso tanto de probióticos como de prebióticos en la prevención de múltiples enfermedades es un recurso interesante para considerar en su prevención (Callaway et al, 2012; Wilson & Krehbiel, 2012). Sin embargo, esta es un área de estudio en pleno desarrollo y sería aventurado identificar una sustancia o un conjunto de ellas como prebióticos teniendo en cuenta las diferencias de los ecosistemas en los que deberían actuar y los diferentes padecimientos que deberían mitigar.

El ambiente ruminal puede ser estudiado a través de métodos experimentales, *in vivo*, *in vitro* e *in situ*. En los métodos *in vivo* se trabaja directamente con animales, pero se asocian con una importante demanda de tiempo y espacio, por lo que son técnicas costosas y laboriosas. Los métodos *in vitro* son más sencillos y menos costosos, aunque simulan la realidad de una manera limitada debido a que no se ejerce control sobre algunos aspectos que definen las condiciones fisiológicas digestivas de los rumiantes (Blümmel & Ørskov, 1993; Carro et al., 2005; Giraldo et al., 2007; Fondevila & 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 (Menke et al, 1979; Beuvink & Spoelstra, 1992; Mauricio et al, 1999; Akinfemi et al, 2009; Vázquez-Armijo et al, 2011).

El objetivo de todos los sistemas de fermentación *in vitro* consiste en crear un entorno que simule una sección específica del tracto gastrointestinal. 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 et al., 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 su inicio presentan un pH inferior al fisiológico debido a la adición de ácidos (cátrico, sulfúrico, clorhídrico o fosfórico) cuyo objetivo fue estudiar la capacidad de la biota ruminal de digerir diferentes sustratos en condiciones de estrés (Colombatto et al, 2007; Kozloski et al, 2007).

En este estudio, se buscó seleccionar la sustancia más apropiada para

utilizar como prebiótico en la prevención de la acidosis ruminal, el cual se podrá administrar durante la alimentación de los animales.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Ambiente ruminal

El rumen alberga e interactúa con una compleja mezcla de organismos unicelulares. En él se dan múltiples relaciones bióticas y se establecen diversos equilibrios metabólicos entre distintos grupos de microorganismos y el huésped. Es un ecosistema autocontenido abierto que tiene como productos de entrada los alimentos y como compuestos de salida ácidos grasos volátiles, amoníaco (NH_3), metano (CH_4), nitrógeno proteico y otros, es decir los nutrientes que el animal necesita y algunos productos metabólicos de desecho. (Hungate, 1966; Osborne & Dehority, 1989; Weimer, 1998; Bach et al., 2005).

Hay factores de diversa naturaleza que pueden incidir en la funcionalidad ruminal. Algunos están más relacionados a la dieta y otros están más relacionados al rumiante (Weimer, 1998; Bannink et al, 2012). En estos animales, el rumen representa aproximadamente 1/7 de la masa corporal y mantiene en su interior determinadas condiciones de anaerobiosis, temperatura y humedad que lo hacen una cámara de fermentación ideal (Russell & Hespell, 1981).

La dinámica ruminal de los alimentos explica gran parte del comportamiento digestivo en los rumiantes y por lo tanto su resultado productivo final. En condiciones normales el sistema mantiene estable su pH gracias a la capacidad tampón de los componentes de la saliva del animal, tiene un eficaz mecanismo de eliminación de los productos que en él se generan (NH_3 , ácidos grasos volátiles) gracias al poder de absorción de sus paredes y permite una renovación continua del contenido gracias al aporte de sustratos a través de los alimentos y al pasaje de los elementos sólidos y líquidos a los tramos posteriores del aparato digestivo (Van Soest, 1994; Sauvante et al., 1999).

Además de los AGV y de la biomasa microbiana, la fermentación en el rumen produce una serie de compuestos como dióxido de carbono, metano, amonio y ácido láctico que constituyen pérdidas de energía y de nitrógeno, cuya acumulación puede provocar serios trastornos. Con la finalidad de disminuir estas pérdidas, incrementar las condiciones de bienestar, aumentar la producción y prevenir la acidosis y sus consecuencias, técnicos y productores han utilizado diversas prácticas de alimentación guiadas a obtener un incremento en la fermentación, lo que se ha convertido en un gran desafío para el equilibrio de la microbiota ruminal, que no siempre responde de la forma predicha o deseada por el productor (Weimer, 1998).

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

2006).

Weimer (1998) estableció algunos principios que rigen el comportamiento de los microorganismos ruminales según el metabolismo de los nutrientes provenientes de los alimentos ingeridos, entre los que se destacan:

- La adaptación para utilizar un compuesto determinado requiere que el mismo esté presente a concentraciones cuya utilización provea una ventaja selectiva para el organismo.
- El incremento de la concentración del catalizador (densidad de microorganismos) no mejorará la tasa metabólica de un proceso si el sustrato es una limitante.
- En un ecosistema establecido, los microorganismos invasores o alóctonos, en general no compiten efectivamente con especies nativas o autóctonas.
- Los microorganismos alóctonos pueden establecerse (volverse autóctonos) llenando un nicho no ocupado.
- Los productos finales del metabolismo de un grupo de microorganismos pueden a menudo ser utilizados como fuentes de energía o sustratos de crecimiento por otro grupo de microorganismos.

Estos principios son consistentes con observaciones realizadas por otros autores (Osborne & Dehority, 1989; Calsamiglia & Ferret, 2002), quienes sugirieron la forma en que sería posible intervenir modificando los equilibrios intermicrobianos en el sentido deseado y la forma en que se podría evitar que los cambios ecológicos no tuvieran repercusiones negativas. Estas estrategias en forma genérica se denominan "modulación" y se pueden traducir, en general, como el desarrollo diferencial de un grupo microbiano a expensas de otro o la mayor producción de un metabolito o el mayor consumo de una sustancia presente en el medio ruminal.

Acidosis ruminal

La acidosis ruminal es un padecimiento de los rumiantes que cursa según el grado de gravedad, con cambios en el pH ruminal que tendrían consecuencias microbiológicas y metabólicas, las cuales impedirían el aprovechamiento de los alimentos. Esto causaría trastornos digestivos con disminución de la motilidad ruminal, estasis ruminal, heces blandas, ruminitis e hiperqueratosis (Nocek, 1997; Keunen et al., 2002). También y como consecuencia de los cambios mencionados puede haber otras repercusiones por la producción de sustancias tóxicas que pasan al torrente sanguíneo y realizan su efecto negativo a distancia dando liberación a la sangre de endotoxinas y padecimientos tales como abscesos, laminitis y otros trastornos locomotores (Nocek, 1997; Gozho et al., 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 por la acumulación de ácido láctico (Nocek, 1997; Beauchemin &

Yang, 2005). Todo ello puede deberse a las características químicas (composición) de la dieta y al estado físico de los alimentos que componen la dieta. La presencia de cantidades importantes de carbohidratos fácilmente fermentables (almidones o de glúcidos simples y oligosacáridos), desequilibran la relación de ácidos grasos aumentando la proporción de ácido propiónico y aumentan la velocidad de producción de AGV y son precursores de la producción de ácido láctico (Sauvant et al, 1999; Keunen et al., 2002; Sauvant et al, 2006). Igualmente el estado físico de los alimentos, sobre todo en el tamaño de partícula de los alimentos fibrosos, disminuye la fibra físicamente efectiva. Esto trae aparejado una disminución en las masticaciones y de la secreción salival. Por ello se pierde una buena parte del efecto tampón que tiene la saliva y repercute en la facilidad con la que disminuye el pH en los animales con esta alimentación (Sauvant et al., 1999; Beauchemin & Yang, 2005; Sauvant et al., 2006; Yang & Beauchemin, 2006).

Las condiciones ruminales óptimas para la producción microbiana que no afectan la degradación de los componentes fibrosos de los forrajes se caracterizan por un pH cercano a la neutralidad (6,7-6,8), una concentración de NH₃ de al menos 5-8 mg/dL y de AGV de 75-90 mmol/L con una relación acético/propiónico de 3,5/1 (Kaufmann y col., 1980; Rearte, 1992; Van Soest, 1994; Rémond y col., 1995). Según Sauvant et al. (1999) el pH límite para considerar una acidosis podría ser de 6,25 y menor a 5,5 para hablar de una acidosis aguda. Otros autores consideran el valor 5,6 como límite para hablar de acidosis ruminal (Keunen et al., 2002; Gozho et al., 2005; Krause & Oetzel, 2005). Independientemente del valor que se considere, en la acidosis, el pH ruminal llega a valores inferiores a aquellos en los que la microbiota puede digerir la fibra en condiciones apropiadas (Beauchemin & Yang, 2005).

Como consecuencia de este descenso de pH, el perfil de la comunidad bacteriana cambia drásticamente aumentando dramáticamente la abundancia relativa de *Streptococcus bovis* y otros microorganismos productores de ácido láctico, con una consecuente disminución de especies consumidoras del lactato, como *Propionibacterium* spp., *Megasphaera elsdenii* y *Selenomonas ruminantium*, alcanzando un estado en el cual los microorganismos que producen ácido láctico sobrepasan a los que lo utilizan (Strobel & Russell, 1986; Russell & Wilson, 1996; Piknova et al., 2004). La biota celulolítica, especializada en la degradación de los carbohidratos que constituyen los componentes fibrosos de los forrajes, también se ve inhibida bajo estas condiciones (Russell & Wilson, 1996).

Mientras el pH continúa disminuyendo, la multiplicación de *S. bovis* cesa, aunque microorganismos del género *Lactobacillus* ocupan el nicho y continúan produciendo ácido láctico (Russell & Hino, 1985). El pH disminuido del rumen también favorece la proliferación de hongos (ej. *Mucor* spp.) que se asocian con repercusiones sistémicas (Lund, 1974) así como bacterias patógenas oportunistas fundamentalmente Gram negativas, como *Fusobacterium necrophorum* (Nocek, 1997).

Los cambios en el rumen dan lugar a una serie de efectos locales y

sistémicos. Como efecto primario se produce una disminución en la motilidad ruminal (éstasis), ruminitis e hiperqueratosis. Estos cambios establecen las condiciones para que diversas bacterias penetren a través de la pared ruminal y puedan alcanzar el hígado donde frecuentemente producen abscesos. Estos cambios también dan lugar a una absorción anormal de ácido láctico hasta un punto en que ya no puede ser amortiguado por los sistemas tampón de la sangre. Otros eventos que ocurren simultáneamente están asociados con el aumento de la presión osmótica ruminal, disminución del volumen extracelular lo que resulta en deshidratación, disminución del gasto (output) cardíaco, perfusión periférica, disminución del flujo sanguíneo renal, shock y muerte (Nocek, 1997).

La acidosis aguda presenta signos y síntomas específicos, por lo que si el problema es detectado a tiempo puede ser tratado correctamente. Son casos bastante individualizables y no siempre corresponden al rodeo. En general tiene una presentación accidental, por ejemplo por acceso de los animales a una fuente de alimento concentrado o por ingesta de este tipo de alimento luego de un ayuno de al menos 24 h (Krause & Oetzel, 2005).

La acidosis ruminal subaguda, en cambio, es un desorden metabólico de importancia en ganado de alta producción como el lechero, con una presentación mucho más frecuente y una gran repercusión económica en la producción (Nocek, 1997). Las pérdidas económicas de SARA se atribuyen no sólo a los problemas de salud, sino también a los costos crecientes de la alimentación debido a la digestión pobre de la fibra y a la eficacia de una alimentación más baja. (Krause & Oetzel, 2005; Firkins et al., 2006). Paradójicamente, las causas de estos trastornos provienen muchas veces por ejemplo de dietas que pretenden maximizar la producción lechera o de aumento de peso en ganado de engorde, con concentrados y forraje con fibra físicamente efectiva (FFE) baja (Nocek, 1997; Beauchemin & Yang, 2005; Yang & Beauchemin, 2006).

Hay autores que han descrito diferencias entre los cuadros de acidosis ruminal en ovinos, discriminando tres cuadros diferentes: acidosis láctica, acidosis subaguda butírica y acidosis subaguda propiónica, cuadros asociados a distintas fuentes de alimentación (Martin et al, 2006; Lettat et al, 2010; Lettat et al, 2012).

Los animales sometidos a regímenes de producción intensivos, son más propensos a sufrir este tipo de desequilibrios. Las prácticas de alimentación que sostienen este alto nivel de exigencia en la producción, desafían continuamente a la biota ruminal, obteniendo a veces resultados no esperados. Debido a ello, numerosos científicos a nivel mundial se han dedicado a la búsqueda de nuevas alternativas de modulación de la biota ruminal (Weimer, 1998; Martin, 1998; Beauchemin & Yang, 2005, Bach et al., 2005).

En muchas ocasiones, forrajes de alta calidad, rápidamente degradables en el rumen pueden provocar cambios en el ecosistema ruminal incluyendo una drástica disminución del pH con las consecuencias ya consideradas (Keunen et al., 2002; Cajarville et al, 2006). Por otra parte, la administración

abundante de concentrados es una práctica común en los en sistemas semi-intensivos e intensivos tanto en ganado de carne como lechero en nuestro país, lo que incrementaría el riesgo de aparición de acidosis.

Si bien en nuestro país no existen datos precisos con respecto a la incidencia de la acidosis y los costos asociados a esta patología, se pueden citar datos de la literatura internacional que establecen que SARA se produce en más de un 20% de vacas post-parto y que en el Reino Unido el costo del incremento de infertilidad relacionado con este proceso equivale un 20% del precio de la leche (Enemark & Jorgensen, 2001). Aunque hace unos años se consideraba que la acidosis era un trastorno prácticamente limitado a la ingesta accidental de concentrados o a los escasos sistemas intensivos instalados en el país, hoy presenta una amplia incidencia en distintos tipos de sistemas y en el marco de un fuerte incremento de la producción bovina ante condiciones económicas favorables para los bienes agropecuarios primarios y sub-productos correspondientes.

Estrategias no antibióticas para incidir en el metabolismo microbiano ruminal

Uno de los principales objetivos de estrategias de modulación de la microbiota ruminal es la prevención de la acidosis (Ghorbani et al., 2002).

El uso de antibióticos, que durante muchos años se aplicó sobre especies productivas con fines de incremento en la producción, ha venido limitándose debido a razones tales como la resistencia bacteriana en medicina humana y por reclamos de los consumidores europeos, hasta su total prohibición a partir del año 2006 (Cepero Briz, 2005; Cogliani et al, 2011).

Mucha de la investigación, de las últimas dos décadas, respecto a la manipulación del ecosistema ruminal para obtener beneficios productivos, ha estado orientada al uso de antibióticos, particularmente los ionóforos como la monesina (Russell & Strobel, 1989). Estas sustancias, entre otros efectos, inhibirían a los microorganismos productores de hidrógeno, a las bacterias productoras de ácido láctico como el *Streptococcus bovis* (Russell & Hino, 1985; Russell, 1987; Russell & Strobel, 1989).

Más recientemente, varios investigadores se han interesado en el uso de microorganismos seleccionados (Direct-Fed Microbial: DFM), que al llevar a un nuevo equilibrio a la biota ruminal, se producen efectos favorables para el huésped, evitando problemas como la acidosis ruminal y ayudándolo en su desempeño productivo (Ghorbani et al., 2002; Beauchemin et al., 2003; Nocek & Kautz, 2006; Wilson & Krehbiel, 2012).

Inhibidores yodados

Una de las estrategias manejadas por los productores y sustentada en una profusa investigación, es el uso de ionóforos como la monensina y otros, los que han venido utilizándose en Estados Unidos, en los Feed Lots desde mediados de la década de 1970 (Schelling, 1984; Newbold & Wallace, 1988; Newbold et al, 1988; Russell & Strobel, 1989; Spears, 1990).

Su principal uso es como inhibidor de la biota productora de metano, aunque se identificaron varios efectos moduladores, como cambios en la relación entre los AGV, cambios en el consumo de alimentos por parte del animal y con repercusión en el valor del pH ruminal (Schelling, 1984; Newbold & Wallace, 1988; Newbold et al, 1988; dos Santos, 2013).

Uso de compuestos con actividad tampón o antiácida

Otra estrategia seguida por algunos investigadores ha sido el uso de sustancias con conocido efecto tampón o antiácido, tales como bicarbonatos, carbonatos, óxido de magnesio y mezclas, tal como lo han expuesto Meschy et al (2004) mediante metaanálisis de 40 publicaciones. Estos autores verificaron la utilidad del empleo de estas sustancias en situaciones críticas.

Extractos de especias (aceites esenciales)

Más recientemente, diferentes autores, sobre todo en Europa, han estudiado el efecto inhibitorio de extractos de hierbas y de especias, así como el uso de aceites esenciales proveniente de dichas especies vegetales (Busquet et al, 2006; Calsamiglia et al., 2007). Éstas tendrían la ventaja de actuar como inhibidores al igual que los antibióticos, pero con la posibilidad de apelar a un “claim” de productos naturales, con una repercusión comercial positiva.

Probióticos y prebióticos

Aunque se han propuesto varias definiciones de probióticos, aunque la más ampliamente aceptada enuncia lo siguiente: “son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del huésped” (FAO/WHO, 2006). Se utilizan microorganismos no patogénicos, los cuáles deben ser ingeridos vivos como monocultivos o en cultivos mixtos, deben llegar a un ecosistema digestivo en el que instalan y a partir de su desarrollo ejercen una influencia positiva en la salud y la fisiología del huésped (Klaenhammer & Kullen, 1999; Marteau et al, 2004).

El uso de probióticos es una práctica que tiene ya varias décadas (Reid, 1999) y en los últimos años se han realizado abundantes estudios sobre los efectos de la administración de cepas seleccionadas en humanos y animales (Cross, 2002). Miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* y *Propionibacterium* han sido utilizados como probióticos fundamentalmente en especies de animales monogástricos (Jan et al, 2002). Se han descrito usos de probióticos en diferentes especies de animales domésticos, desde mamíferos (tanto monogástricos como rumiantes), hasta aves e incluso animales acuáticos (Zani et al, 1998; Lema et al, 2001; Nayak et al, 2007; Willis & Reid, 2008).

Existen suficientes evidencias que demuestran efectos benéficos de los probióticos en animales de producción, entre los que se encuentran la estimulación del sistema inmune, aumento de la ganancia de peso corporal, disminución de diarreas y mejora de la eficiencia de la conversión del

alimento (Collins & Gibson, 1999; Patterson et al., 2003; Nocek & Kautz, 2006).

El campo del empleo de bacterias probióticas con efectos en la esfera ruminal constituye un área de creciente interés pero a la vez compleja en virtud de las características fisiológicas de estas especies. Miembros de los géneros *Propionibacterium*, *Selenomonas* y *Megaesphaera* tendrían un efecto beneficioso en el rumen, en particular previniendo el descenso del pH a través del empleo del lactato acumulado, incrementando la degradación de la celulosa (ayudado por hongos como *Aspergillus oryzae*), tanto como *Ruminococcus spp.*, inhibiendo el desarrollo de microorganismos potencialmente patógenos (ej. *Escherichia coli* O157:H7) e incluso reduciendo la emisión de metano (Martin & Nisbet, 1992; Jouany et al., 1998; Lema et al, 2001; Ghorbani et al., 2002; Brashears et al., 2003).

Los prebióticos, mientras tanto, son compuestos orgánicos no digeribles por el sujeto al que se le administran. Son utilizados por un segmento más o menos específico de la biota bacteriana obteniendo el huésped que la alberga, a través de ello, un efecto positivo (Marteau et al, 2004; Tuohy et al., 2005). Estas sustancias deben resistir los procesos digestivos hasta llegar a su sitio de acción. Allí actúan como sustrato selectivo de un número limitado de bacterias comensales potencialmente benéficas, estimulándolas a crecer y/o activándolas metabólicamente. Logran cambiar la biota cuali y cuantitativamente a una proporción más saludable (Collins & Gibson, 1999). Un ejemplo de esto es el desarrollo de microorganismos que compiten y desplazan a patógenos, debido al aporte de estas sustancias (de Vaux et al., 2002). Otros efectos benéficos que se pueden comprobar son algunos de los correspondientes a los probióticos, ya que éstos son los microorganismos favorecidos selectivamente por los prebióticos (Liong & Shah, 2005a; Liang & Shah, 2005b).

Se denominan sin-bióticos (syn-biotics) a las combinaciones de probióticos con prebióticos, produciendo estos últimos, un efecto específico positivo sobre los primeros (Marteau et al, 2004; Tuohy et al., 2005). Estas combinaciones garantizan la supervivencia de los microorganismos, con un sustrato específico rápidamente disponible, que además garantiza al menos el efecto benéfico para el cuál el prebiótico es el precursor (Martin, 1998; Montañó et al., 1999; Collins & Gibson, 1999, Mwenya et al., 2005).

Sustancias que podrían tener efecto prebiótico en rumiantes

Levaduras inactivadas

Proveen de β -glucanos (50%), manano-proteínas (40%) y quitina (3%) del peso de la materia seca celular (Kollár et al, 1997; Lipke & Ovalle, 1998). Varios de estos compuestos son oligosacáridos, sustancias identificadas con actividad prebiótica.

Se ha estudiado en experimentos *in vitro* el efecto de levaduras inactivadas por autoclavado sobre la funcionalidad ruminal resultando estimuladora de la misma (Oeztuerk et al, 2005). Con similar objetivo se han

realizado experimentos *in vivo* con levaduras inactivadas por calor con efectos positivos en la moderación del descenso del pH en vaquillonas (Vyas et al, 2013). Por otra parte, Posadas et al (2010) demostraron un efecto prebiótico utilizando una fracción de manano-proteína en la prevención de *Salmonella typhimurium* en ratas, la cual redujo significativamente la colonización intestinal de este microorganismo.

Otro uso de mananooligosacáridos (MOS) proveniente de levadura *Saccharomyces cerevisiae* como antagonista de especies de *Salmonella* en aves fue descrito por Spring et al (2000), disminuyendo la colonización intestinal mediante el bloqueo de la adherencia al epitelio a través de la fimbria Tipo I.

Ácido málico y malato

Hay innumerables trabajos sobre el efecto del ácido málico y del malato sobre rumiantes, tanto estudios *in vivo* como estudios *in vitro* (Nisbet & Martin, 1990; Callaway & Martin, 1996; Martin, 1998; Montaña et al, 1999; Carro & Ranilla, 2003; Martin, 2005). Algunos de los trabajos *in vivo*, se realizaron utilizando ácido málico directamente (Montaña et al, 1999) con un incremento del pH en los animales suplementados respecto de aquellos que no lo fueron.

Inulina

La inulina es un oligosacárido cuya molécula es mayoritariamente un fructano que en los extremos tiene unidas unidades de glucosa. A pesar que la inulina se utiliza predominantemente en humanos (Lion & Shah, 2005a y 2005b) y en monogástricos en general (Van Loo, 2007), existen estudios realizados en RUSITEC simulando la actividad ruminal (Öztürk, 2008 y 2009), en los cuales inulina de diferente procedencia tuvo variaciones en su efecto sobre la biota ruminal, descendiendo el pH en forma significativa los productos de origen chino y alemán aunque con mayor producción de algunos AGV, en particular butírico, valérico e iso-valérico.

Sorbitol

El sorbitol es un alcohol polihidroxílico, generalmente usado como edulcorante no calórico (aunque produce 3 kcal/g de energía bruta).

Hay pocos trabajos utilizando esta sustancia en rumiantes. Se destaca en particular un estudio en bovinos en el que se utilizó sorbitol solo y combinado con monensina obteniendo una mayor eficiencia en la conversión de los alimentos en masa corporal en la etapa de terminación (Fontenot & Huchette, 1993).

Métodos de fermentación *in vitro* utilizados para evaluar la función digestiva animal

El ambiente ruminal puede ser estudiado a través de diversos métodos experimentales, como son las técnicas *in vivo*, *in vitro* e *in situ*. La ventaja de los métodos *in vivo* es que se aproximan más a la realidad, se trabaja 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 (Carro et al., 2005; Giraldo et al., 2007; Fondevila & 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 la medición de producción de gas otros estudios como la cinética de fermentación, grado de digestibilidad de los alimentos, evaluación del pH, entre otros (Martin & Nisbet, 1990; Nisbet & Martin, 1991; Callaway & Martin, 1996; Martin, 1998).

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; Amer, et al, 2012). La versatilidad del método ha permitido su empleo para estudios de diferente índole, incluso la predicción del rendimiento industrial de materias primas de origen agropecuario (Weimer et al, 2005), así como para evaluar la fertilidad de suelos (Tscherning et al, 2005) en los que resultó ser de gran utilidad.

Asimismo, todos los elementos utilizados para su armado y realización pueden ser constantes - para que no influyan en el resultado de los experimentos -, o variables - como factores experimentales -, tanto en el continente (Menke et al, 1979; Beuvink & Spoelstra, 1992; Menke & Seingass; Theoudouru et al, 1994; Fondevila & Pérez-Espes, 2008; Gonzáles et al, 2013) como en el contenido (Beuvink & Spoelstra, 1992; Akinfemi et al, 2009; Antolín et al, 2009; Vázquez-Armijo et al, 2011; Amer, et al, 2012; Durmic et al, 2012; Gonzáles et al, 2013; Elghandour et al, 2013; Murray et al, 2014).

Debido a dicha versatilidad, en este trabajo se seleccionó el método *in vitro* de producción de gas para estudiar el posible efecto modulador de las sustancias a ensayar y para estudiar el pH como variable de medida de sus efectos, sobre una simulación de la acidosis ruminal. Al ser razonablemente económico y de porte pequeño, permitió también ensayar varias sustancias y a diferentes dosis simultáneamente.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

1. Los métodos de fermentación ruminal *in vitro* son útiles para evaluar el efecto de distintos aditivos en la prevención de la acidosis ruminal.
2. Algunos aditivos pueden ejercer un efecto modulador sobre el ambiente de sistemas de fermentación *in vitro*, en una situación simulada de acidosis.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto modulador de sustancias potencialmente prebióticas como preventivas de acidosis utilizando sistemas de fermentación ruminal *in vitro*.

Objetivos específicos

Adaptar la técnica *in vitro* de fermentación anaerobia con producción de gas, conocida como “gas-*in-vitro*”, a condiciones de simulación de acidosis ruminal.

Evaluar la performance de levaduras inactivadas, inulina, sorbitol, ácido málico y malato de sodio, sindicadas como potenciales prebióticos, como preventivos de acidosis generadas en ensayos *in vitro*.

ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

En el marco de esta Tesis se realizaron cinco experimentos sucesivos, mediante los cuales se pretendió, testear distintos prebióticos y a la vez modificar las condiciones del método *in vitro*, de forma que respondiera con más efectividad en forma consistente y similar a la acidosis real. De esta manera, cada experimento, surgió como necesario para responder preguntas emergidas del experimento anterior y de ese método de trabajo surge la secuencia de experimentos.

En el primer experimento se pretendieron estudiar los potenciales efectos de las sustancias seleccionadas (levaduras inactivadas, inulina, sorbitol y ácido málico), a través de la cantidad de gas producido, en fermentadores en los cuales se simulaba una acidosis ruminal. También tuvo como objetivo, buscar para ulteriores experimentos, los tiempos en el transcurso de la fermentación en los que pudiera resultar crítica la medición del pH del medio.

En el segundo experimento, se pretendió realizar el mismo tipo de ensayo que el anterior, haciendo algunos ajustes (se redujo la duración total; se

preparó un conjunto completo de fermentadores para cada tiempo de medida) y siguiendo el mismo diseño que el usado en el experimento anterior. En este caso solamente se midió pH.

En el tercer experimento se pretendieron encontrar cambios en las condiciones de tamponamiento de los fermentadores a través de modificaciones en la composición de las salivas artificiales de manera de poder visualizar en mejores condiciones la evolución del pH los posibles efectos de los aditivos. En este caso no se incluyeron las sustancias a testar como moduladores sino que se utilizaron solamente pares de sistemas de fermentación (con y sin sustrato). Este experimento fue el de menos duración (18 h) y se registraron tanto la producción de gas (2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 h) como el pH (inicial y final).

En el cuarto experimento se realizaron dos ensayos simultáneos. Por un lado se realizó una réplica ajustada del segundo experimento, pero con una saliva artificial seleccionada de entre las utilizadas en el tercer experimento y por otro se comparó ésta con otras salivas artificiales de diferente preparación.

Finalmente se realizó un quinto experimento, que fue una réplica del cuarto experimento, pero utilizando una saliva artificial seleccionada en este último, con el fin de evaluar la potencial capacidad de los aditivos como moduladores de la fermentación en el entendido que las nuevas condiciones de tamponamiento permitirían visualizar mejor los posibles efectos de los aditivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción general del sistema experimental usado

Se realizaron diversos ensayos en fermentadores *in vitro*, aplicando el método «gas-*in vitro*» (Menke et al, 1979; Theodorou et al, 1994; Rymer et al, 2005) modificado para las condiciones establecidas para esta tesis.

Todos los ensayos *in vitro* se realizaron en el laboratorio de Nutrición Animal, ubicado en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria.

En todos los ensayos se utilizaron frascos de 125 mL de capacidad, cerrados herméticamente con tapón de goma y precintados, manteniendo en su interior un medio anaerobio. Cada frasco contenía un sistema de fermentación anaerobia que se tomó como unidad experimental.

En todos los ensayos, se utilizó como inóculo, 10 mL de líquido ruminal obtenido de la misma vaca donadora, canulada en el rumen y alimentada con una mezcla de forraje, ensilado y concentrado. El líquido ruminal se extrajo en el momento previo a su utilización. El contenido ruminal extraído fue filtrado mediante una tela de queso plegada en cuatro capas, de manera de separar el líquido de las partículas. El líquido así obtenido, fue transportado inmediatamente en un envase térmico al laboratorio, donde se mantuvo con barboteo de CO₂ permanente hasta su dosificación en las unidades experimentales.

Como sustrato se utilizó una mezcla, en partes iguales en base de materia seca (MS, m/m), de granos de cebada y pasturas en estado vegetativo. Este sustrato al estar constituido principalmente por hidratos de carbono solubles y fácilmente fermentescibles, se usó en los fermentadores para provocar una condición simulada de acidosis ruminal. Ambos alimentos fueron secados (70 °C, hasta peso constante) y molidos hasta un tamaño máximo de partícula de menos de 0.5 mm previo a su mezcla. Los aditivos (sustancias testadas) se agregaron en la dosis correspondiente, según el diseño experimental de cada ensayo, de manera de completar 500 mg de sustrato total. Se testaron las siguientes sustancias:

- Levadura inactivada: se utilizó la cepa ATCC-18824* de *Saccharomyces cerevisiae*. Se obtuvo como producto deshidratado, granulado, el cuál fue inactivado en estufa a 70 °C durante 36 h.
- Inulina[§]: adquirida a un proveedor comercial de ingredientes para alimentos de uso humano.
- Sorbitol[¥]: adquirido a un proveedor comercial de ingredientes para alimentos de uso humano.

* CODENOR S.A. - CBS1171

§ L&G S.A. - Frutafit® HD

¥ L&G S.A. - WA020 Lote 4116236906

- Ácido málico[£]: adquirido a un proveedor comercial de ingredientes para alimentos de uso humano.
- Malato de sodio: se utilizó un tratamiento experimental con esta sustancia en el último ensayo, neutralizando estequiométricamente ácido málico con hidróxido de sodio dentro de las unidades experimentales correspondientes.

En cada unidad experimental, se agregaron 40 mL de una solución *buffer* (saliva artificial), cuya composición varió según los objetivos de cada ensayo (ver Tablas I a IV).

Para mantener las condiciones de anaerobiosis se empleó, una solución de Na₂S al 6%, en una dosis de 0,5 mL por unidad experimental.

Durante los cinco ensayos, los tratamientos experimentales fueron incubados a 39°C, en baños de agua termostatzados, durante períodos de 18 a 96 h, según el objetivo de cada ensayo. La excepción, fueron aquellos tratamientos identificados como de inicio de cada experimento (tiempo 0).

Tabla I. Saliva artificial SA01[§] – solución basal (composición por litro)*

Ingrediente	Cantidad
KCl	0,6 g
NaCl	0,6 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1,46 g
Na ₂ HPO ₄	3,55 g
Solución minerales traza ¹	10,00 mL
Solución Hemina ²	10,00 mL
Agua destilada (csp)	1000,00 mL

1. Solución de minerales traza: MnCl₂·4H₂O 0,025g; . FeSO₄·7H₂O 0,0200g; ZnCl₂ 0,025g; CuCl₂·2H₂O 0,025g; CoCl₂·6H₂O 0,050g; SeO₂ 0,050g; NiCl₂·6H₂O 0,250g; Na₂MoO₄·2H₂O 0,250g; NaVO₃ 0,0314g; H₃BO₃ 0,250g. Se disuelven los ingredientes en el orden citado, en HCl 0,02 M y se lleva a 1L con agua destilada.

2. Preparación de la solución de Hemina: Disolver 0,1g de Hemina en una pequeña cantidad de NaOH 0,05 M. Llevar a 1 L con agua destilada hervida (con CO₂ burbujeando).

* Esta saliva artificial se completa con una solución de bicarbonato a razón de 38 mL de solución principal y 2 mL de solución de bicarbonato (Preparación: Se disuelven 82g de Na₂CO₃ en 1 L de agua destilada, haciendo burbujear CO₂) § Tomada de Britos et al, 2005.

Tabla II. Modificaciones realizadas a la saliva artificial SA01

Saliva artificial SA01a	Sustitución de Na₂CO₃ + CO₂, por NaHCO₃ En la solución de bicarbonato, se disolvieron 82 g de NaHCO ₃ en 1 L de agua destilada. Luego, se procedió como lo usual.
Saliva artificial SA01b	Dilución de la solución basal con solución salina + sustitución de Na₂CO₃ + CO₂, por NaHCO₃ Se preparó una solución salina (NaCl 0.9 % en agua destilada p/v) y con ella se diluyó la solución basal a la mitad de la concentración. Luego se agregó la solución de bicarbonato modificada.
Saliva artificial SA01c	Preparación de solución basal con fosfatos reducidos A la fórmula de la SA01 original se le redujo la cantidad de KH ₂ PO ₄ de 1,46 g a 0,73 g y se redujo la cantidad de Na ₂ HPO ₄ de 3,55 g a 1,775 g.
Saliva artificial SA01d	Eliminación del Na₂CO₃ (sin agregado de NaHCO₃) + Saliva diluida a la mitad Eliminación del Na ₂ CO ₃ (sin agregado de NaHCO ₃). Dilución de la solución madre al 50% con solución salina.
Saliva artificial SA01e	Eliminación del Na₂CO₃ (sin agregado de NaHCO₃) + Reducción de fosfatos Eliminación del Na ₂ CO ₃ (sin agregado de NaHCO ₃). Reducción de fosfatos en la solución madre.
Saliva artificial SA00	Sustitución completa de saliva artificial Sustitución completa por solución salina fisiológica.

*Tabla III. Saliva artificial SA02 (composición por litro)**

Ingrediente	Cantidad	
Na ₂ HPO ₄	0,300	g
KH ₂ PO ₄	0,153	g
NaHCO ₃	2,625	g
HCl	0,250	g
NaCl	0,375	g
MgSO ₄	0,112	g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,050	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,800	mg
MnSO ₄	4,000	mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,000	mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,000	mg
CoCl ₂	1,000	mg
K ₂ SO ₄	0,150	mg

* Tomada de Tung & Kung, 1993

*Tabla IV. Saliva artificial SA03 (composición por litro)**

Ingrediente	Cantidad	
NaHCO ₃	4,0	g
K ₂ HPO ₄	0,45	g
KH ₂ PO ₄	0,45	g
NaCl	1,00	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,09	g
CaCl ₂	0,09	g
Hemina	0,01	g

* Modificada de Duncan et al., 2003

En los Experimentos 1 y 3 se midió la producción de gas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 h y en aquellos en que tuvieron mayor duración, se midió además a las 24 (Experimentos 1 y 5) y a las 36, 48, 72 y 96 h (Experimento 1). Inmediatamente de medir la presión en los frascos se igualaron las presiones interna y externa. En los experimentos en que no se realizó esta medición, igualmente se realizó el procedimiento de nivelación de presiones

para no interferir con la fermentación.

Diseños experimentales

Experimento 1

Este experimento se realizó con el fin de elegir los tiempos que podrían resultar más convenientes para realizar en posteriores experimentos las mediciones de pH ya que las mismas requieren la apertura de las unidades experimentales y en cambio la medición de la producción de gas se realiza con las mismas unidades a lo largo del ensayo.

Se utilizaron 13 tratamientos experimentales, de los cuales, uno (TAC) se empleó como control, simulando una situación de acidosis (conteniendo sólo el sustrato y sin aditivos) y doce tratamientos correspondientes a cuatro sustancias testadas, cada una de ellas en tres dosis: 3, 9 y 15 % de la materia seca respecto al sustrato total (alimento más aditivo = 500 mg). Las mencionadas sustancias fueron: levadura inactivada (SCI: SCI03, SCI09, SCI15); inulina (INU: INU03, INU09, INU15); sorbitol (SOR: SOR03, SOR09, SOR15); ácido málico (MAL: MAL03, MAL09, MAL15). Se añadió un blanco (TSS) para la corrida y tanto el blanco como los tratamientos experimentales fueron utilizados por triplicado.

Se realizaron medidas de la presión en el espacio de cabeza de cada unidad experimental[§] a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h desde el inicio de la incubación. Luego de cada medida se purgó el gas hasta igualar las presiones, de manera que cada nueva medida representara el volumen incremental.

La variable de respuesta fue la producción de gas, expresada como volumen de gas acumulado, la cual fue medida por medio de un manómetro como presión en el espacio de cabeza de las unidades experimentales y convertida a volumen según la Ecuación 1, realizada en un experimento previo. Los valores así convertidos se fueron sumando para cada tiempo de medida con el fin de obtener el volumen acumulado.

Ecuación 1: Conversión de la medida de presión "P" (PSI) a volumen de gas "V" (mL) $V = 4,4P + 0,09P^2$

Posteriormente se restó el valor promedio de los tratamientos TSS, en cada tiempo, para obtener el volumen de gas acumulado debido solamente a los tratamientos experimentales.

Finalmente los valores se ajustaron a un contenido de 1 g de sustrato total.

Para las repeticiones de cada tratamiento experimental, se realizó un procedimiento de regresión no lineal, procurando ajustar los datos obtenidos del experimento a un modelo matemático (ver Ecuación 2 y Figura 1) basado en el modelo de von Bertalanffy (Del Valle, 1986; Theodorou et al, 1994;

[§] Manómetro D1005PS (Ashcroft®, Stratford, CT, USA)

Antolín et al, 2009; de Andrade Souza et al, 2011).

Ecuación 2: Modelo utilizado para realizar la regresión no lineal de los datos experimentales. $Vol = VPM(1 - pVI e^{-mt})$

El coeficiente de determinación se calculó, realizando una regresión lineal entre los valores experimentales y los predichos, siendo estos últimos la variable dependiente.

Este modelo presentó tres parámetros:

- **VPM:** Volumen Potencial Máximo
- **pVI:** Volumen que se pierde al inicio del experimento
- **m:** tasa metabólica en el sistema

siendo las variables **Vol:** la variable de respuesta, volumen acumulado; **t:** el tiempo de fermentación.

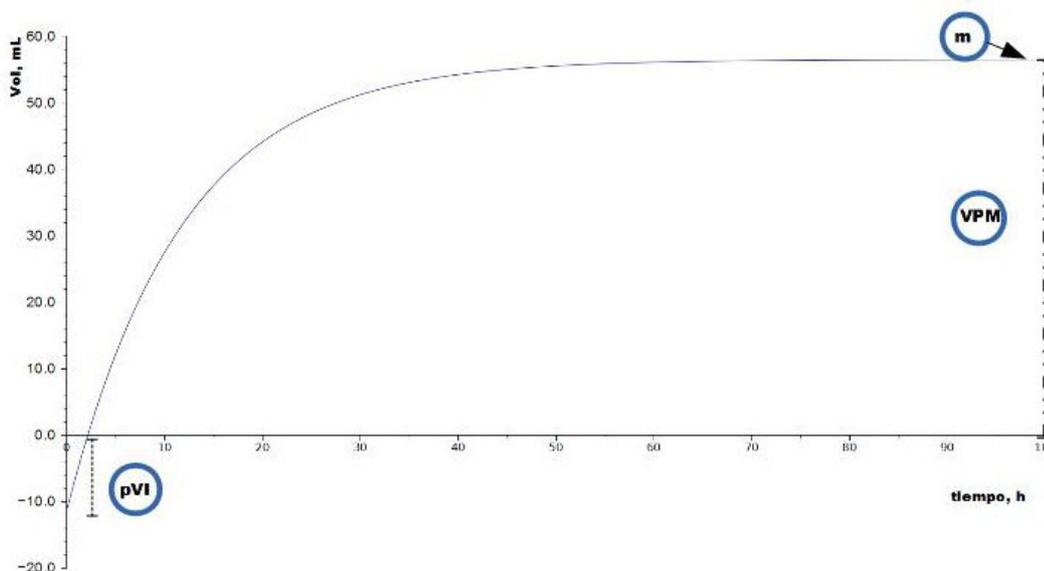


Figura 1. Representación gráfica del modelo de von Bertalanffy utilizado para la regresión no lineal practicada al Vol acumulado de gas en función del tiempo, en fermentadores anaeróbicos. Se muestran los parámetros de la regresión. VPM ; pVI; m.

Para cada parámetro, se realizó un Análisis de Varianza entre todos los tratamientos. Como test *a posteriori*, se utilizó el test HDS de Tukey. En todos los casos se consideró un valor de $\alpha = 0,05$.

Experimento 2

Este experimento se realizó como un primer intento de verificar que la duración total y los tiempos de medición de pH (con apertura de las unidades

experimentales) resultaran apropiados para medir variaciones relevantes en el pH y posibles efectos de los aditivos de los que se buscaba medir su potencial efecto modulador del pH.

Para cada conjunto o set de unidades experimentales (uno por tiempo de medición) se utilizaron 13 tratamientos experimentales, y se agregó un conjunto de sistemas de fermentación sólo con líquido ruminal y saliva artificial (TSS) que se utilizó como control de la funcionalidad del líquido ruminal. De los tratamientos experimentales, uno (TAC) se empleó como control, simulando una situación de acidosis y doce tratamientos correspondientes a cuatro sustancias testadas (levadura inactivada: SCI; inulina: INU; sorbitol: SOR; ácido málico: MAL), cada una de ellas en tres niveles: 3, 9 y 15 % de la materia seca respecto al sustrato total (alimento más aditivo = 500 mg).

Todos los tratamientos fueron utilizados por triplicado, excepto TAC y TSS que se utilizaron por sextuplicado ya que eran controles.

La variable de respuesta fue el pH del contenido de las unidades experimentales. Al ser destructiva esta medición, fue necesario trabajar con un conjunto completo de datos para cada tiempo en el que se midió la variable. Esto se hizo a las 0, 4, 12 y 36 h desde el inicio de la incubación (las unidades experimentales correspondientes al tiempo cero, no fueron incubadas). Así se totalizaron 192 unidades experimentales (4 conjuntos de 48 unidades).

Durante la incubación, se igualaron a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 y 36 h, la presión interna de los sistemas de fermentación con la presión ambiental.

Para realizar la medición del pH, se realizó la apertura de cada sistema de fermentación, se extrajo inmediatamente todo el contenido a un recipiente en el cual se realizó la medida propiamente dicha con un dispositivo potenciométrico digital[§].

Se realizó un procedimiento de regresión no lineal, procurando ajustar los datos obtenidos del experimento a un modelo exponencial (ver Ecuación 3). El modelo se seleccionó debido a su buen ajuste y a la obtención de parámetros que explicaban bien el comportamiento de este tipo de experimento.

Ecuación 3: modelo exponencial utilizado en la regresión no lineal

$$pH_{SIS} = VpH e^{-FAS t} + pH_f$$

Se calculó el coeficiente de determinación, realizando una regresión lineal entre los valores experimentales y los predichos, siendo estos últimos la variable dependiente.

Este modelo, presentó tres parámetros:

- **VpH:** Variación del pH. Representa el descenso total del pH en las

[§] Medidor de pH digital, marca Oakton, Acorn pH 5, USA.

condiciones experimentales; marca indirectamente el valor inicial de pH;

- **FAS:** Factor Asociado al Sustrato; marca la velocidad de descenso del pH en las condiciones experimentales;
- **pHF:** pH final o pH límite (valor mínimo que es capaz de alcanzar el sistema en las condiciones experimentales)

siendo las variables **pH_{SIS}**: la variable de respuesta, pH obtenido en el sistema; **t**: es el tiempo de fermentación, en horas .

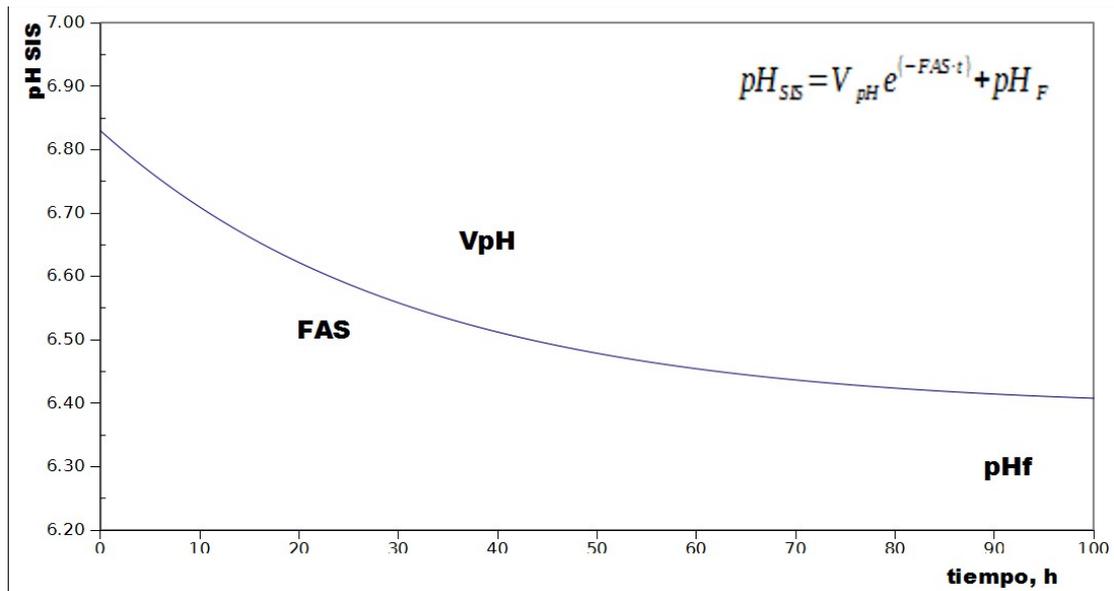


Figura 2. Representación gráfica del modelo exponencial utilizado para la regresión no lineal practicada al pH en función del tiempo, en fermentadores anaeróbicos. Se muestran los parámetros de la regresión. V_{pH} representa la variación total del pH a lo largo del experimento; FAS representa la velocidad de producción de ácidos; pH_f representa el valor que tendría el pH hacia el final del experimento.

Para cada parámetro obtenido, se realizó un Análisis de Varianza entre todos los tratamientos. Como test *a posteriori*, se utilizó el test HDS de Tukey. En todos los casos se consideró un valor de $\alpha = 0,05$.

Adicionalmente, los datos de pH de los sistemas suplementados con los distintos aditivos testados y para cada tiempo se compararon con el control (TAC) mediante un Análisis de Varianza. Como test *a posteriori*, se utilizó el test HDS de Tukey. En todos los casos se consideró un valor de $\alpha = 0,05$.

Experimento 3

En esta instancia se utilizaron 12 tratamientos experimentales, en los que se testaron variantes de la saliva artificial utilizada en los experimentos anteriores (ver Tabla I), en pares con y sin sustrato acidogénico.

La identificación de los tratamientos experimentales utilizados se muestra

en la Tabla V.

Tabla V. Identificación de los tratamientos experimentales

		Salivas artificiales*					
		SA01a	SA01b	SA01c	SA01d	SA01e	SA00
Sustrato	Sin	TSSA	TSSB	TSSC	TSSD	TSSE	TSS0
	Con	TACA	TACB	TACC	TACD	TACE	TAC0

**Identificación de las salivas artificiales: SA01=saliva empleada en experimento anterior; SA01a=Sustitución de $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2$, por NaHCO_3 ; SA01b=Dilución de la solución basal con solución salina + sustitución de $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2$, por NaHCO_3 ; SA01c=Preparación de solución basal con fosfatos reducidos; SA01d=Eliminación del Na_2CO_3 (sin agregado de NaHCO_3) + Saliva diluida a la mitad; SA01e=Eliminación del Na_2CO_3 (sin agregado de NaHCO_3) + Reducción de fosfatos; SA00=Solución Salina Fisiológica.*

Se confeccionaron dos juegos de unidades experimentales. Un conjunto no fue incubado, correspondiendo al tiempo inicial (0 h), mientras que el otro se incubó a 39°C durante 18 h. Todos los tratamientos experimentales se emplearon por triplicado.

Durante el período de incubación se tomaron medidas de la presión de gas en el espacio de cabeza de los sistemas de fermentación a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 h a partir del comienzo de la incubación, procediéndose para la obtención de los datos y para su análisis ulterior, de igual manera que para el Experimento 1.

Al inicio del experimento, se realizó la medición del pH del contenido de las unidades experimentales correspondientes a las 0 h y al final del período de incubación, se realizó la medición del pH del contenido de las unidades experimentales de la misma manera que se realizó en el Experimento 2.

Se analizaron para cada saliva artificial utilizada, los pares con y sin sustrato, mediante el estadístico t de Student y para un valor de $\alpha = 0,05$.

En el caso de cada saliva artificial utilizada se analizaron, los pares 0 y 18 h, mediante el estadístico t de Student y para un valor de $\alpha = 0,05$.

Experimento 4

En este caso se realizaron dos ensayos simultáneos. Por un lado se testaron dos nuevas salivas artificiales (SA02 y SA03), esta vez realizando cambios sustanciales en su composición y en su preparación, frente a SA01e que seleccionó a partir de los resultados del Experimento 3 como una modificación de la saliva artificial SA01 que fuera utilizada en el Experimento 2 (ver tablas III y IV).

Por otro lado, se realizó un experimento casi idéntico al Experimento 2, salvo por dos excepciones: se cambió la saliva SA01 por la SA01e y se cambió el período de incubación, de 36 a 24 h

Se utilizaron 14 tratamientos experimentales, por triplicado. De ellos, doce correspondieron a las cuatro sustancias testadas (levadura inactivada: SCI; inulina: INU; sorbitol: SOR; ácido málico: MAL), cada una de ellas en tres niveles: 3, 9 y 15 % de la materia seca respecto al sustrato total (alimento más aditivo = 500 mg) y los otros dos tratamientos se emplearon, también por triplicado, como controles. Uno de ellos (TSS) se utilizó como control de la funcionalidad del líquido ruminal, mientras que el otro (TAC) se empleó como control simulando una situación de acidosis.

En las dos partes del experimento, las unidades experimentales se incubaron, excepto las correspondientes al inicio (0 h), durante 24 h, determinándose el pH a las 4, 12 y 24 h con idéntico procedimiento al descrito en el Experimento 2.

Respecto a la primera parte del experimento, los datos obtenidos fueron analizados mediante el estadístico t de Student para los pares sin y con sustrato y se realizó una regresión no lineal ajustando para un modelo exponencial (Ecuación 3) de la misma manera que en el Experimento 2, estudiándose los parámetros obtenidos para las diferentes salivas artificiales en los tratamientos que simulaban acidosis ruminal, mediante ANOVA simple.

Para el análisis de los datos obtenidos de la segunda parte del experimento se siguió idéntico procedimiento estadístico que en el Experimento 2, mediante ANOVA simple ($\alpha=0,05$) entre las tres dosis de cada aditivo y en control, para cada tiempo de medición (0, 4, 12 y 24 h). En los casos que se estableció diferencias significativas entre los tratamientos analizados ($p<0,05$), se aplicó como test *a posteriori*, el HSD de Tukey ($\alpha=0,05$).

Experimento 5

En este caso se utilizaron 17 tratamientos experimentales, de los cuales, uno (TSS) se utilizó como control de la funcionalidad del líquido ruminal, otro (TAC) sin aditivos, se empleó como control simulando una situación de acidosis y otros quince tratamientos correspondientes a las cinco sustancias testadas (levadura inactivada: SCI; inulina: INU; sorbitol: SOR; ácido málico: MAL; malato de sodio: MDS), cada una de ellas en tres niveles: 3, 9 y 15 % de la materia seca respecto al sustrato total (alimento más aditivo = 500 mg). Todos los tratamientos fueron utilizados por triplicado. En este experimento se utilizó la saliva artificial SA03 (ver Tabla IV)

Las principales variables registradas fueron la producción de gas y el pH del contenido de las unidades experimentales.

La producción de gas se registró a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 h con el mismo procedimiento de los Experimentos 1 y 3.

Al ser necesario abrir cada frasco para medir el pH, fue necesario trabajar con un conjunto completo de unidades para cada tiempo en el que se midió la variable. Esto se hizo a las 0, 4, 12 y 24 h desde el inicio de la incubación (las unidades experimentales correspondientes al tiempo cero, no fueron incubadas). Así se totalizaron 204 unidades experimentales (4 conjuntos de 51). Para registrar los datos correspondientes, se siguió idéntico procedimiento que en el Experimento 2.

Se extrajeron muestras, a las 24 h, para medir posteriormente la producción de NH_3 (5 mL de líquido fermentado recogido en un recipiente conteniendo 5 mL de una solución de NaCl al 20 %) y de ácidos grasos volátiles (AGV): acético, propiónico, butírico, valérico e isovalérico (1 mL de líquido fermentado recogido en un recipiente conteniendo 1 mL de ácido perclórico: HClO_4).

El NH_3 se midió mediante una técnica de titulación con HCl valorado, a partir de la destilación de las muestras (con el destilado recogido con ácido bórico) de manera similar a la que se procede en la técnica de determinación de nitrógeno proteico, de Kjeldahl (AOAC, 2000). Se calculó el contenido de NH_3 , expresado en mEq/mL, utilizando una fórmula para deducir dicha magnitud (ver Ecuación 4).

Ecuación 4: Cálculo de la cantidad producida de NH_3 , expresada en

$$\text{mEq/mL } \text{NH}_3 = \frac{V_1 - V_0}{VM} \times N$$

V_1 = gasto de la solución valorada hasta el viraje del indicador

V_0 = gasto del ensayo en blanco

VM = volumen inicial de material a testar

N = Normalidad de la solución valorada de HCl

Los ácidos orgánicos fueron determinados mediante HPLC (Fraga et al,

2013). Se utilizó un sistema Waters modular (Waters Associates, Milford, MA), con una bomba binaria (Waters, modelo 1525), un automuestreador (Waters, modelo 717 plus), una columna de fase reversa C18 (5-mm particles, 150×34.6 mm; Phenomenex, Torrance, CA) y un detector con arreglo de fotodiodos (Waters model 2998). El sistema utilizó el software de datos cromatográficos Empower 2 (Waters).

Las muestras se centrifugaron (15000 rpm, 15 min, 5 °C) y 100 µL del sobrenadante de cada una se inyectó en la columna (una por vez).

La columna se mantuvo a una temperatura de 30 °C. La fase móvil usada fue: (A) acetonitrilo y (B) ácido fosfórico (H₃PO₄) 0,5%, pH=2 y fue bombeada a razón de 1 mL/min, mediante el siguiente gradiente (min/%B): 2/98; 12/50; 12,25/95; 17,25/95; 17,50/2; 23/2.

El análisis cuantitativo se realizó tomando como referencia los cromatogramas realizados a partir de una solución estándar con 5mg/mL de cada ácido.

Tabla VI. Resumen operativo de los cinco experimentos realizados

Nº tratamientos	Saliva Artificial	Aditivos candidatos a prebióticos	Variables medidas
Experimento 1 - Objetivo principal: Evaluar la capacidad de modulación de 4 aditivos en fermentadores simulando acidosis ruminal			
12 + Control (TAC)	SA01	SCI03, SCI09, SCI15 INU03, INU09, INU15 SOR03, SOR09, SOR15 MAL03, MAL09, MAL15	Gas acumulado (mL)
Experimento 2 - Objetivo principal: Evaluar la capacidad de modulación de 4 aditivos en fermentadores simulando acidosis ruminal			
12 + Control (TAC)	SA01	SCI03, SCI09, SCI15 INU03, INU09, INU15 SOR03, SOR09, SOR15 MAL03, MAL09, MAL15	pH
Experimento 3 - Objetivo principal: Estudiar el descenso de pH en acidosis ruminal simulada en diferentes condiciones de tamponamiento			
6 + 6 Controles (TSS)	SA01a, SA01b SA01c, SA01d SA01e, SA00		Gas acumulado (mL); pH
Experimento 4a - Objetivo principal: Estudiar el descenso de pH en acidosis ruminal simulada en diferentes condiciones de tamponamiento			
3 + 3 Controles (TSS)	SA01e SA02 SA03		pH
Experimento 4b - Objetivo principal: Evaluar la capacidad de modulación de 4 aditivos en fermentadores simulando acidosis ruminal			
12 + Control (TAC)	SA01e	SCI03, SCI09, SCI15 INU03, INU09, INU15 SOR03, SOR09, SOR15 MAL03, MAL09, MAL15	pH
Experimento 5 - Objetivo principal: Evaluar la capacidad de modulación de 5 aditivos en fermentadores simulando acidosis ruminal			
15 + Control (TAC)	SA03	SCI03, SCI09, SCI15 INU03, INU09, INU15 SOR03, SOR09, SOR15 MAL03, MAL09, MAL15	Gas acumulado (mL); pH; NH ₃ ; AGV

Análisis estadísticos

Para la mayor parte de los análisis se trabajó con un software de planilla electrónica (Libre-Office - Calc v 4.1.5.3 y/o GNUmeric 1.9.1) haciendo los

planteos de los cálculos en forma «manual». Para otros análisis se utilizó el software de análisis estadístico de uso libre PAST, versión 3.01 (Hammer et al, 2001).

Las variables pH y producción de gas acumulada, se ajustaron a los modelos que se indicaron mediante procedimientos de regresión no lineal, verificando el ajuste mediante regresiones lineales entre los valores predichos y los datos reales.

En los casos que fue necesario analizar los datos mediante análisis de varianza, previamente se realizaron el Test de Shapiro-Wilk para verificar Normalidad ($\alpha=0,05$) y el Test de Levene ($\alpha=0,05$) para verificar la homocedasticidad. En los casos que se verificó heterocedasticidad ($p<0,05$), se practicó el test de Kruskal-Wallis, seguido del test de Mann-Whiney cuando $p<0,05$.

En los casos en que se requirió analizar datos de pares de tratamientos (experimento 3 y primera parte del experimento 4), se utilizó el test t de Student cuando se verificó homocedasticidad (test de Levene) y el test de Mann-Whitney cuando los datos resultaron heterocedásticos. En todos los tests se consideró un $\alpha=0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1

Este experimento exhibió la producción de gas de sistemas de fermentación en condiciones que simulaban una acidosis ruminal y el efecto de sustancias que potencialmente podrían moderar la misma.

Todas las unidades experimentales mostraron un comportamiento similar en el transcurso del experimento, respecto al volumen acumulado final. En las Figuras 3 y 4, se ilustran las dinámicas de producción de gas de todos los tratamientos.

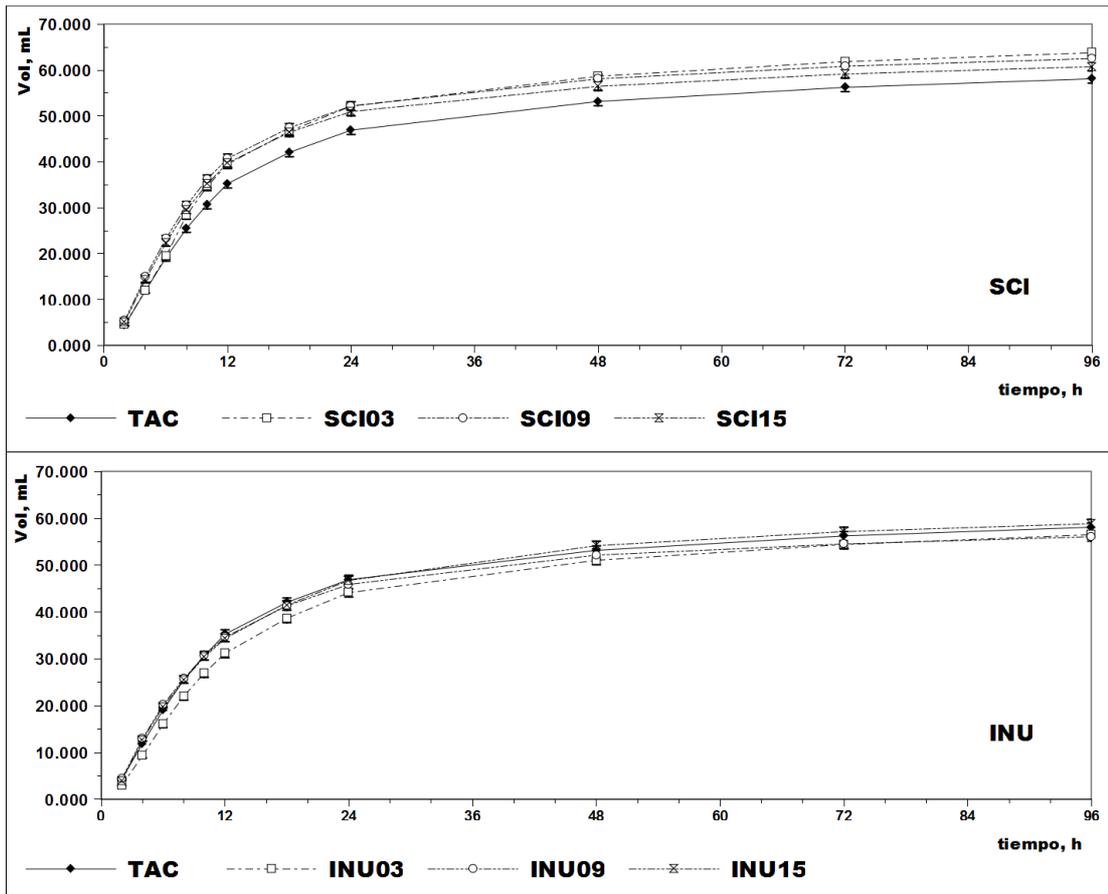


Figura 3. Experimento 1. Evolución de la producción de gas a lo largo del experimento. Cada gráfica incluye las tres dosis de cada aditivo testado y el tratamiento control. En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar. **Identificación de los tratamientos:** TAC=tratamiento control; SCI03, SCI09, SCI15: levadura inactivada al 3, 9 y 15%; INU03, INU09, INU15: inulina al 3, 9 y 15 %

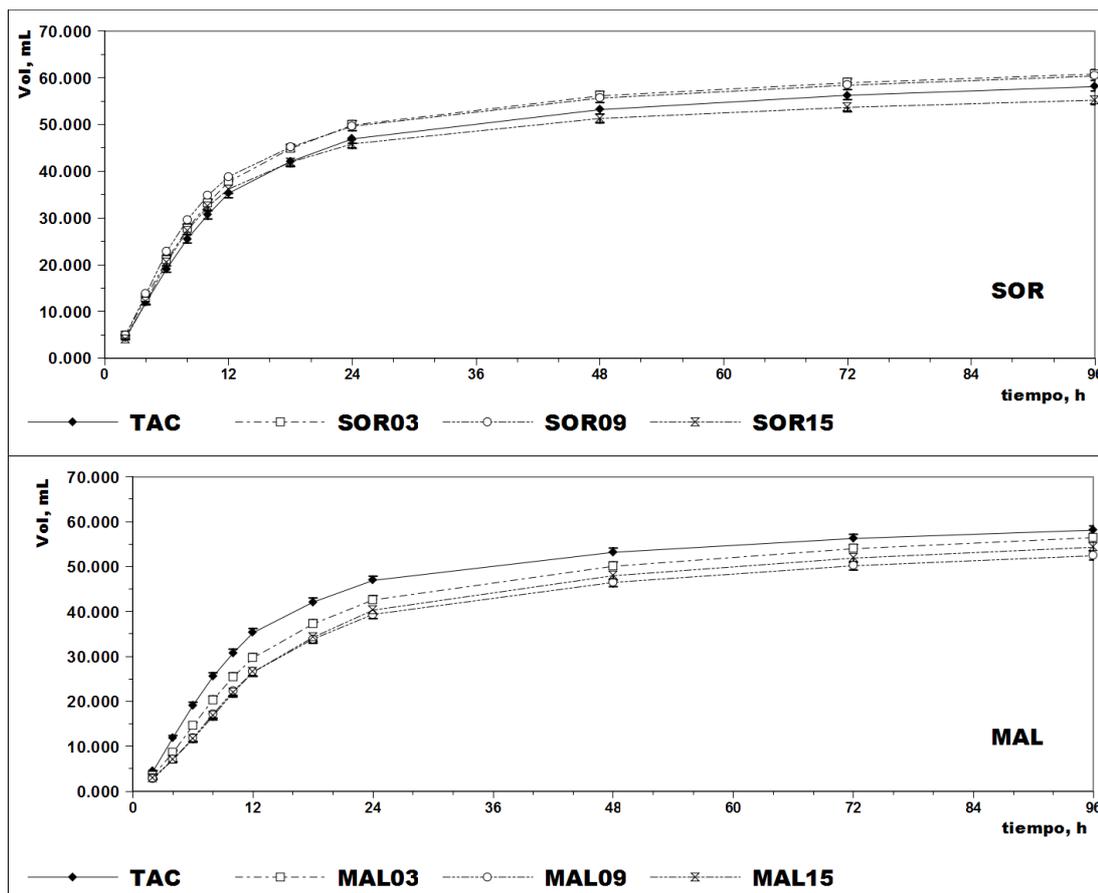


Figura 4. Experimento 1. Evolución de la producción de gas a lo largo del experimento. Cada gráfica incluye las tres dosis de cada aditivo testado y el tratamiento control. En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar. **Identificación de los tratamientos:** TAC=tratamiento control; SOR03, SOR09, SOR15: sorbitol al 3, 9 y 15%; MAL03, MAL09, MAL15: ácido málico al 3, 9 y 15 %

Los parámetros de la cinética de producción de gas para los distintos tratamientos se observan en la Tabla VII.

No se encontraron diferencias significativas para el parámetro "VPM" ($p > 0,05$) correspondiente al máximo volumen que potencialmente podría producirse, pero si se hallaron tales diferencias para los otros dos ($p < 0,05$).

Para el valor "pVI", los tratamientos que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al tratamiento control (TAC), fueron: INU09, INU15, MAL03, MAL09 y MAL15 (ver Tabla VII).

Respecto al parámetro "m", los tratamientos que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tratamiento control (TAC), fueron SOR09, MAL03, MAL09 y MAL15 (ver Tabla VII).

En una fermentación de hasta 96 h, todos los tratamientos produjeron potencialmente la misma cantidad de gas (**VPM**), pero hubo variaciones en la velocidad con la que alcanzaron dicho volumen (**m**) con tratamientos experimentales que fueron más veloces (SOR09) y otros más lentos (MAL03, MAL09, MAL15) así como en la fermentación inicial (**pVI**) en la que los tratamientos que se diferenciaron mostraron valores menores (INU09, MAL03, MAL09, MAL15).

Tabla VII. Experimento 1. Evaluación de la producción de gas mediante regresión no lineal. Se muestran los valores medios obtenidos para los parámetros: Volumen Potencial Máximo (VPM), proporción del VPM fermentada al inicio (pVI), velocidad o tasa metabólica (m).

Parámetros	Aditivo*	Dosis (%)				EE [§]	p _{ANOVA} [£]
		0*	3	9	15		
VPM	SCI	58,31	61,9	58,84	57,29	1,328	0,7054
	INU	58,31	54,35	53,18	56,19	1,827	0,8209
	SOR	58,31	57,43	56,34	53,23	0,838	0,1400
	MAL	58,31	54,54	51,07	53,50	1,322	0,2950
pVI	SCI	1,082	1,096	1,071	1,082	0,0063	0,6360
	INU	1,082 ^a	1,050 ^{a,b}	1,040 ^b	1,017 ^{a,b}	0,0085	0,0244
	SOR	1,082	1,053	1,078	1,084	0,0050	0,0818
	MAL	1,082 ^a	1,018 ^b	1,024 ^b	1,017 ^b	0,0087	0,0007
m	SCI	0,079	0,083	0,095	0,095	0,0031	0,1663
	INU	0,079	0,066	0,083	0,072	0,0041	0,5231
	SOR	0,079 ^a	0,083 ^{a,b}	0,095 ^b	0,092 ^{a,b}	0,0024	0,0338
	MAL	0,079 ^a	0,056 ^b	0,051 ^b	0,047 ^b	0,0043	0,0069

Notas: ¥ Identificación de los aditivos: SCI=levadura inactivada, INU=inulina, SOR=sorbitol, MAL=ácido málico; * la dosis identificada como 0% en todas las filas, corresponde al tratamiento control (TAC); § EE=Error Estándar; £ están tabulados los valores "p" reales de los correspondientes Análisis de Varianza (ANOVA), se consideran diferencias significativas cuando el valor de $p < 0,05$ y aquellos tratamientos que muestran diferencias significativas (HSD de Tukey) entre si están marcados con letras superíndices diferentes.

Experimento 2

Este experimento registró las variaciones de pH en fermentadores que simulaban una acidosis ruminal y el efecto de sustancias que potencialmente podrían moderar la misma.

En las Figuras 5 y 6, se ilustra la evolución del pH de todos los tratamientos durante 36 h de fermentación.

A lo largo del experimento, los tratamientos con Ácido málico (MAL) mostraron diferencias significativas, en los valores de pH, respecto al tratamiento control ($p < 0,05$), aunque con valores menores, excepto a las 36h (Figura 6).

Hacia las doce horas de incubación, todos los tratamientos mostraron diferencias significativas en los valores de pH respecto al control ($p < 0,05$) y todos fueron inferiores al mismo. Sin embargo a las 36 h, los aditivos SCI (9 y 15%) y SOR (3%) mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control con valores de pH superiores (Figuras 5 y 6).

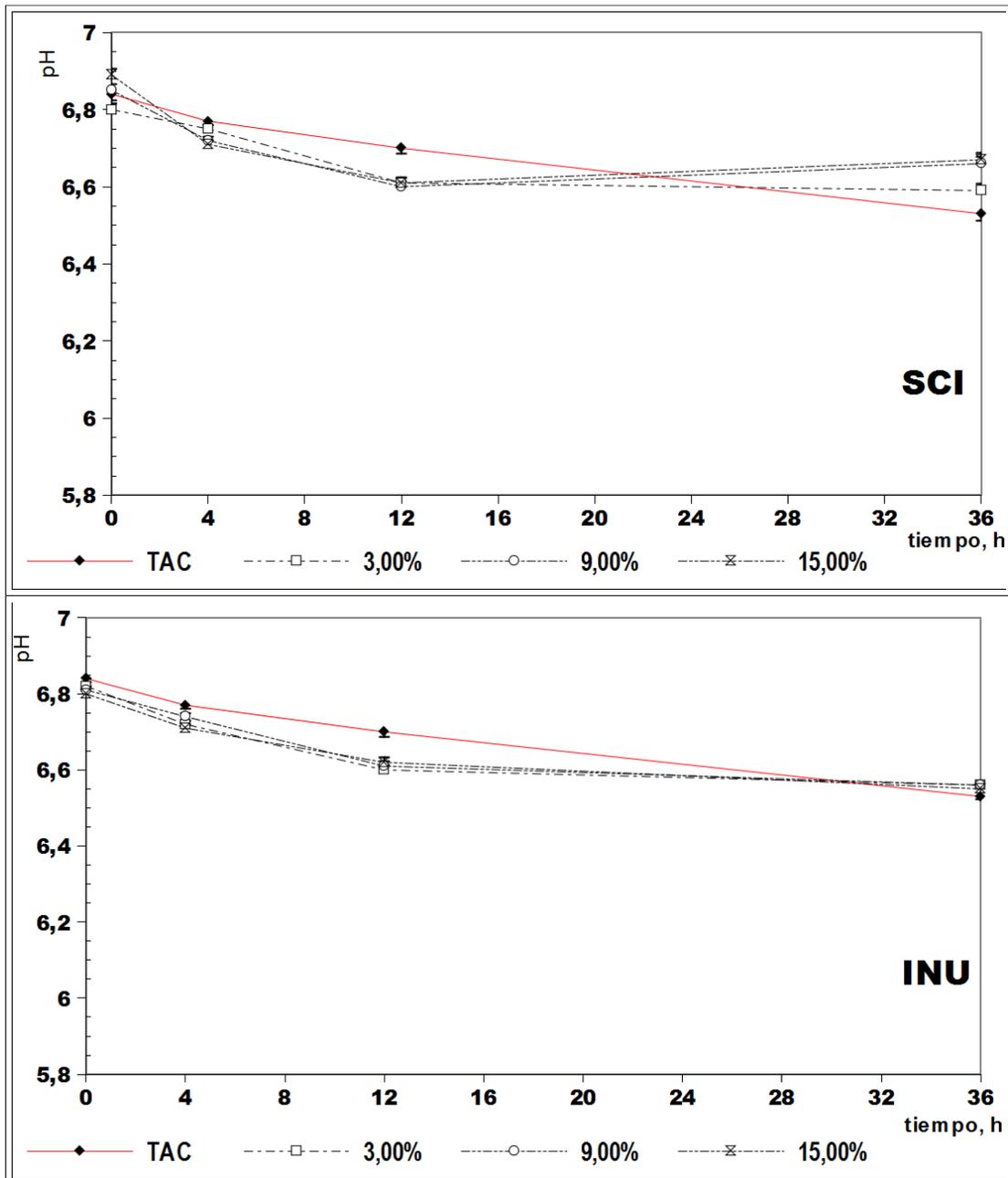


Figura 5. Experimento 2. Evaluación del pH a lo largo de 36 h de fermentación. Se muestran los tratamientos experimentales con los aditivos SCI (levadura inactivada) e INU (inulina) incluidos en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. En cada gráfica se incluye el tratamiento control (TAC). En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar.

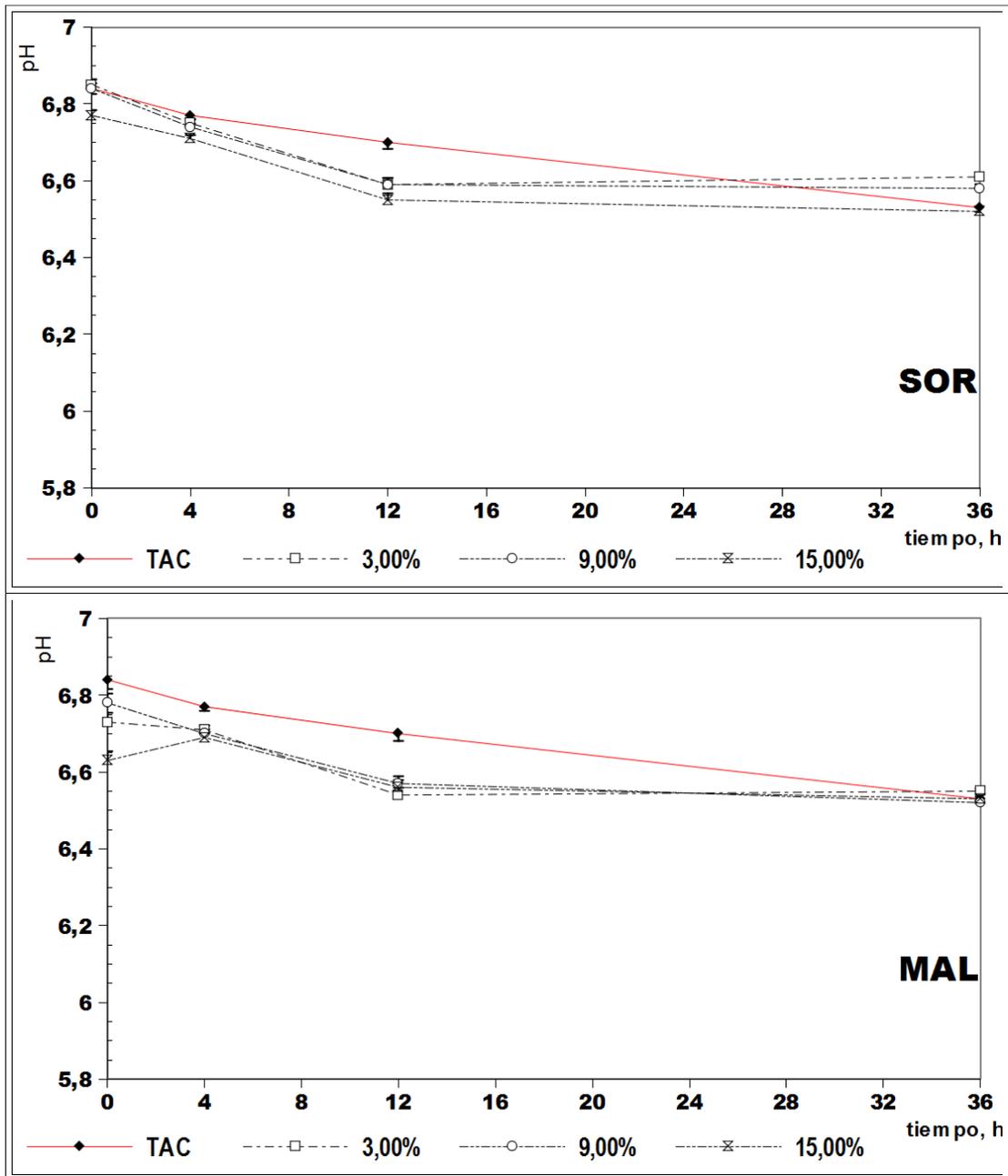


Figura 6. Experimento 2. Evaluación del pH a lo largo de 36 h de fermentación. Se muestran los tratamientos experimentales con los aditivos SOR (sorbitol) e MAL (ácido málico) incluidos en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. En cada gráfica se incluye el tratamiento control (TAC). En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar.

Analizando los parámetros de las regresiones no lineales realizadas, se encontró que **pH_f** (pH final) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con la excepción de SCI09 y SCI15 que mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) con respecto al tratamiento control (Tabla VIII). En general, el pH de todos los tratamientos experimentales resultó mayor que el del tratamiento control (TAC < MAL < INU < SOR < SCI), pero los anteriormente reseñados fueron los únicos con diferencias significativas. Todos los demás no mostraron tales diferencias ($p > 0,05$; Tabla VIII).

Para el parámetro **VpH** (rango recorrido por la variable desde el mayor valor - al inicio del experimento - hasta su menor valor - al finalizar el mismo), se encontraron algunos tratamientos experimentales (INU09, INU15; SOR09, SOR15; MAL03, MAL15) con diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$). Esto podría interpretarse como un menor descenso de los valores del pH a lo largo del experimento (Tabla VIII).

Para el parámetro **FAS** (factor asociado al sustrato), en todos los aditivos testados, se encontraron tratamientos con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control (SCI09, SCI15; INU03; SOR03, SOR09; MAL03, MAL09), siendo el valor absoluto de los mismos mayor al que exhibió el control. Al ser un parámetro de signo negativo (marca la velocidad de descenso del pH), correspondería a una mayor velocidad en los tratamientos indicados respecto al tratamiento control (ver Tabla VIII).

Tabla VIII. Experimento 2. Comparación de los valores de los parámetros **VpH**, **FAS** y **pHf**, obtenidos de la regresión no lineal de los datos experimentales de pH. Se muestran los valores medios de dichos parámetros y el error estándar del conjunto de datos de los mismos. En los casos que se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) se aplicó el test HDS de Tukey, indicándose con letras diferentes en cada fila.

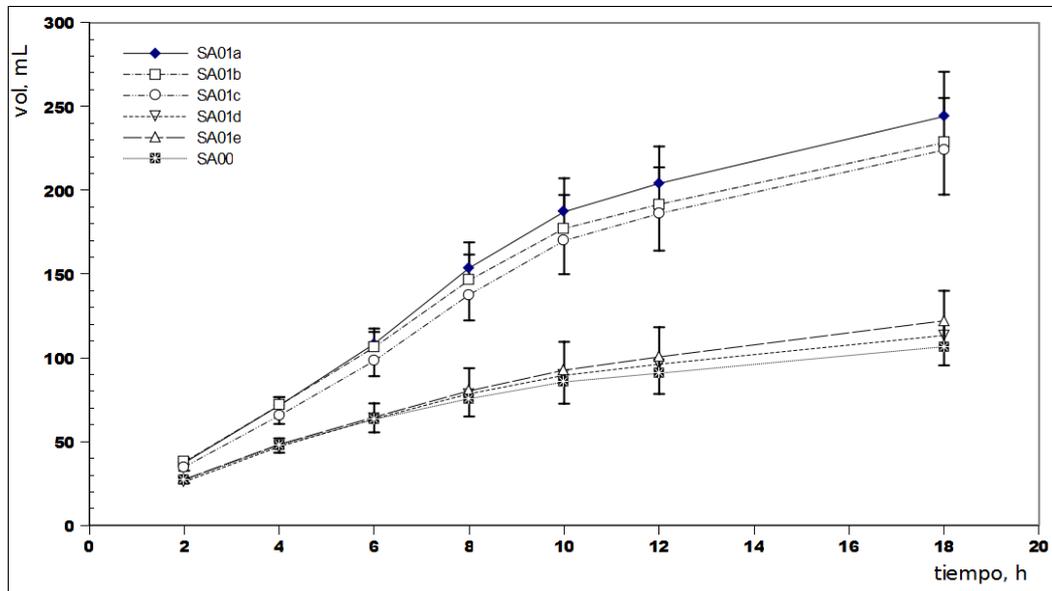
Parámetros	Aditivo*	Dosis(%)				EE§	p _{ANOVA} £
		0*	3	9	15		
VpH	SCI	0,440	0,233	0,222	0,254	0,0419	0,0589
	INU	0,440 ^a	0,275 ^{a,b}	0,268 ^b	0,259 ^b	0,3416	0,0367
	SOR	0,440 ^a	0,267 ^{a,b}	0,281 ^b	0,277 ^b	0,0361	0,0401
	MAL	0,440 ^a	0,217 ^b	0,271 ^{a,b}	0,159 ^b	0,0403	0,0061
FAS	SCI	-0,032 ^a	-0,118 ^{a,b}	-0,267 ^b	-0,349 ^b	0,0551	0,0317
	INU	-0,032 ^a	-0,133 ^b	-0,103 ^{a,b}	-0,107 ^{a,b}	0,0138	0,0438
	SOR	-0,032 ^a	-0,174 ^b	-0,152 ^b	-0,113 ^{a,b}	0,0165	0,0006
	MAL	-0,032 ^a	-0,123 ^b	-0,115 ^b	-0,048 ^{a,b}	0,0113	0,0142
pHf	SCI	6,39 ^a	6,57 ^{a,b}	6,63 ^b	6,64 ^b	0,0415	0,0256
	INU	6,39	6,55	6,55	6,54	0,0349	0,1504
	SOR	6,39	6,59	6,57	6,51	0,0360	0,0906
	MAL	6,39	6,53	6,51	6,50	0,0325	0,2430

Notas: ¥ Identificación de los aditivos: SCI=levadura inactivada, INU=inulina, SOR=sorbitol, MAL=ácido málico; * la dosis identificada como 0% en todas las filas, corresponde al tratamiento control (TAC); § EE=Error Estándar; £ están tabulados los valores "p" reales de los correspondientes Análisis de Varianza (ANOVA), se consideran diferencias significativas cuando el valor de $p < 0,05$ y aquellos tratamientos que muestran diferencias significativas (HSD de Tukey) entre si están marcados con letras superíndices diferentes.

Experimento 3

En este experimento se midieron simultáneamente dos variables para evaluar seis variaciones realizadas a la saliva artificial usada en los experimentos previos, en cuanto a que permitieran visualizar mejor el efecto de la acidosis ruminal simulada, como se vino estudiando en aquellos experimentos. En la Figura 7, se ilustran las dinámicas de producción de gas con las diferentes modificaciones realizadas sobre la formulación original de la Saliva SA01.

A lo largo del experimento se pudieron apreciar dos comportamientos, uno exhibido por los frascos con las salivas SA01a, SA01b y SA01c (ver Tabla III) con mayor producción de gas y otro más moderado mostrado por los tratamientos SA01d, SA01e y SA00 (ver Tabla III).



Una vez analizados los parámetros de las regresiones no lineales realizados a partir de esta variable respecto al tiempo, se encontró que los tratamientos SA01d, SA01e y SA00 fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que los tratamientos SA01a, SA01b y SA01c en los parámetros

VPM y **pVI**, mientras que para el parámetro **m** SA01d y SA00 fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que SA01c, teniendo los restantes valores intermedios ($p > 0,05$, Tabla IX).

Tabla IX. Experimento 3. Evaluación de la producción de gas mediante regresión no lineal. Se muestran los valores medios obtenidos para los parámetros: Volumen Potencial Máximo (**VPM**), proporción del VPM fermentada al inicio (**pVI**), velocidad o tasa metabólica (**m**) y el error estándar del conjunto de datos comparados.

Parámetros	Variaciones testadas de la saliva artificial SA01*						EE [§]	p_{ANOVA} [£]
	SA01a	SA01b	SA01c	SA01d	SA01e	SA00		
VPM	311,10 ^a	284,23 ^a	293,14 ^a	129,32 ^b	149,06 ^b	118,39 ^b	20,45	<0,001
pVI	1,087 ^a	1,077 ^a	1,073 ^a	1,012 ^b	0,981 ^b	0,988 ^b	0,011	0,002
m	0,094 ^{a,b}	0,098 ^{a,b}	0,087 ^a	0,117 ^b	0,094 ^{a,b}	0,125 ^b	0,004	0,001

Notas: * Identificación de las salivas artificiales: SA01=saliva empleada en experimento anterior; SA01a=Sustitución de $Na_2CO_3 + CO_2$, por $NaHCO_3$; SA01b=Dilución de la solución basal con solución salina + sustitución de $Na_2CO_3 + CO_2$, por $NaHCO_3$; SA01c=Preparación de solución basal con fosfatos reducidos; SA01d=Eliminación del Na_2CO_3 (sin agregado de $NaHCO_3$) + Saliva diluida a la mitad; SA01e=Eliminación del Na_2CO_3 (sin agregado de $NaHCO_3$) + Reducción de fosfatos; SA00=Solución Salina Fisiológica. § EE=Error Estándar; £ están tabulados los valores "p" reales de los correspondientes Análisis de Varianza (ANOVA), se consideran diferencias significativas cuando el valor de $p < 0,05$ y aquellos tratamientos que muestran diferencias significativas (HSD de Tukey) entre si están marcados con letras superíndices diferentes.

El pH, por otra parte, mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) desde el inicio del experimento considerando los pares con y sin sustrato; sólo en el caso de las salivas artificiales SA01c y SA01d no hubo tal diferencia ($p > 0,05$). Para los frascos correspondientes a las 18 h de fermentación en todos los pares con/sin sustrato se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$; ver Tabla X) con menores valores de pH en aquellos tratamientos con sustrato que simulaban la acidosis ruminal.

Considerando esta variable, en pares 0 y 18 h, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los casos que incluyeron el mismo sustrato acidogénico, mientras que sólo hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en los tratamientos experimentales sin sustrato, con las salivas artificiales SA01d y SA00 en los cuales el pH ascendió hacia las 18 h (ver Tabla XI).

Tabla X. Experimento 3. Evaluación de los cambios en los valores de pH en fermentadores in vitro mediante *t* de Student. Se muestran los valores medios de pH al inicio y al final del experimento, con sustrato acidogénico (izquierda) y sin el mismo (derecha), para cada variación* sobre la saliva artificial SA01 a testar.

Saliva artificial	Tiempo	Sustrato		E. E. §	$p_{\text{sustrato}}^{\text{£}}$
		con	sin		
SA01a	0	6,61	6,69	0,039	0,0224*
	18	6,47	6,80		0,0046*
SA01b	0	6,42	6,50	0,045	0,0100*
	18	6,21	6,58		0,0050*
SA01c	0	6,51	6,62	0,040	0,0631
	18	6,35	6,69		0,0004*
SA01d	0	5,90	5,96	0,111	0,1998
	18	5,14	6,06		< 0,001*
SA01e	0	6,01	6,14	0,091	0,0021*
	18	5,42	6,13		0,0009*
SA00	0	5,74	5,81	0,110	0,0494*
	18	5,03	5,98		0,0038*

Notas: * Identificación de las salivas artificiales: SA01=saliva empleada en experimento anterior; SA01a=Sustitución de $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2$, por NaHCO_3 ; SA01b=Dilución de la solución basal con solución salina + sustitución de $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2$, por NaHCO_3 ; SA01c=Preparación de solución basal con fosfatos reducidos; SA01d=Eliminación del Na_2CO_3 (sin agregado de NaHCO_3) + Saliva diluida a la mitad; SA01e=Eliminación del Na_2CO_3 (sin agregado de NaHCO_3) + Reducción de fosfatos; SA00=Solución Salina Fisiológica. § EE=Error Estándar; £ están tabulados los valores "p" reales de los correspondientes *t* de Student. En aquellos casos en que se encontraron diferencias significativas se marcó el valor correspondiente de *p* con un asterisco ($\alpha=0,05$).

Tabla XI. Experimento 3. Comparación de los valores de pH en fermentadores in vitro mediante *t* de Student. Se muestran los valores medios de pH con sustrato acidogénico y sin el mismo, al inicio (izquierda) y al final del experimento (derecha), para cada variación* sobre la saliva artificial SA01 a testar.

Saliva artificial	sustrato	tiempo		EE [§]	p _{tiempo} [£]
		0	18		
SA01a	con	6,61	6,47	0,039	0,0390*
	sin	6,69	6,80		0,0533
SA01b	con	6,42	6,21	0,045	0,0005*
	sin	6,50	6,58		0,2748
SA01c	con	6,51	6,35	0,040	0,0032*
	sin	6,62	6,69		0,1688
SA01d	con	5,90	5,14	0,111	0,0002*
	sin	5,96	6,06		0,0129*
SA01e	con	6,01	5,42	0,091	0,0011*
	sin	6,14	6,13		0,8901
SA00	con	5,74	5,03	0,110	<0,001*
	sin	5,81	5,98		0,0015*

Notas: * Identificación de las salivas artificiales: SA01=saliva empleada en experimento anterior; SA01a=Sustitución de Na₂CO₃ + CO₂, por NaHCO₃; SA01b=Dilución de la solución basal con solución salina + sustitución de Na₂CO₃ + CO₂, por NaHCO₃; SA01c=Preparación de solución basal con fosfatos reducidos; SA01d=Eliminación del Na₂CO₃ (sin agregado de NaHCO₃) + Saliva diluida a la mitad; SA01e=Eliminación del Na₂CO₃ (sin agregado de NaHCO₃) + Reducción de fosfatos; SA00=Solución Salina Fisiológica. § EE=Error Estándar; £ están tabulados los valores "p" reales de los correspondientes *t* de Student. En aquellos casos en que se encontraron diferencias significativas se marcó el valor correspondiente de *p* con un asterisco ($\alpha=0,05$).

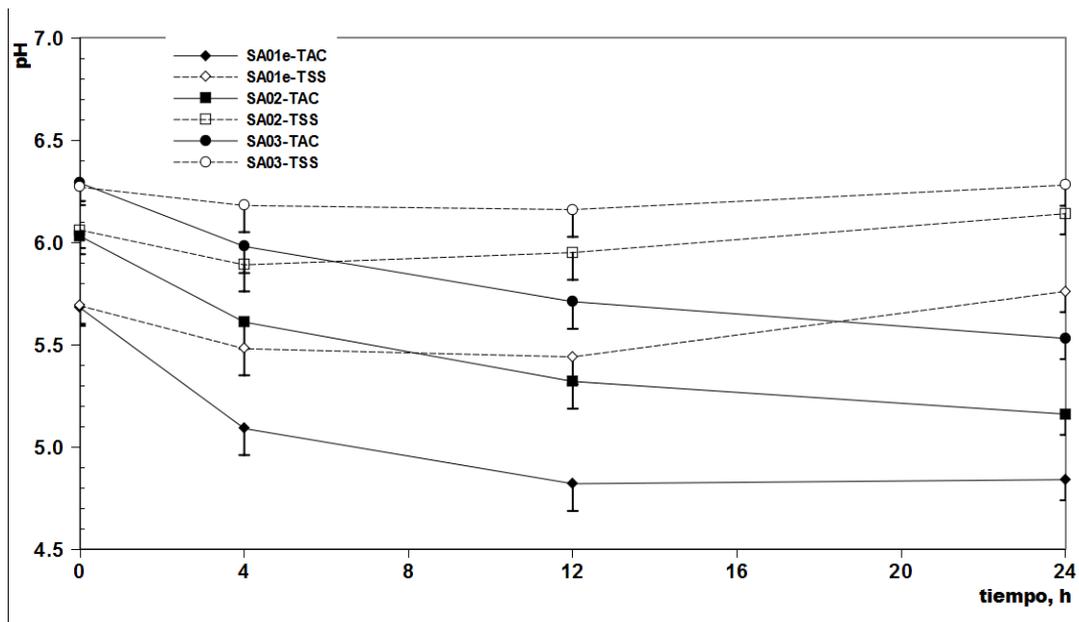
Experimento 4

Estudio de la variación de pH con tres diferentes salivas artificiales

En la Figura 8 se puede observar la evolución del pH a lo largo de 24 h de fermentación, comparando el efecto de tres salivas artificiales seleccionadas en base a su facilidad de preparación en función del objetivo perseguido (menor nivel de tamponamiento).

Al inicio del experimento, para todas las salivas artificiales testadas, los pares con y sin sustrato no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$). No obstante, a las 4, 12 y 24 h, se encontraron diferencias significativas para todas las salivas ($p<0,05$) siendo de menor valor los tratamientos con sustrato ya que simulaban la acidosis ruminal.

Al comparar los tratamientos con sustrato entre si y aquellos sin sustrato entre si, en ambos casos se encontró diferencias significativas (ANOVA y Tukey, $p<0,05$) entre todos los tratamientos durante todo el experimento.



Al analizar los parámetros de las regresiones no lineales realizadas, no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$; ver Tabla XII) en **VpH**, excepto cuando se comparó el par con y sin sustrato correspondiente a la saliva artificial SA03 (Mann-Whitney, $p<0,05$; ver Tabla XIII).

Para el parámetro **FAS** (que marca la velocidad de descenso del pH), se encontraron diferencias significativas (Kruskall-Wallis & Mann-Whitney, $p<0,05$; Tabla XII) entre la saliva SA01e (valor absoluto mayor implicando

una mayor velocidad de descenso del pH) y las otras dos en aquellos tratamientos con sustrato. También hubo diferencias significativas (Mann-Whitney, $p < 0,05$; Tabla XIII) entre los tratamientos con y sin sustrato con la saliva SA01e.

Respecto al parámetro **pHf**, tanto los tratamientos con sustrato como los que no lo tenían mostraron diferencias significativas (Kruskal-Wallis y Mann-Whitney⁶, $p < 0,05$) al ser comparadas las tres salivas, resultando todas diferentes: SA01e < SA02 < SA036 (ver Tabla XII). Los pares con y sin sustrato resultaron significativamente diferentes (Mann-Whitney, $p < 0,05$) para las salivas artificiales SA02 y SA03 solamente (ver Tabla XII).

Tabla XII. Experimento 4. Comparación de los valores de los parámetros VpH, FAS y pHf, obtenidos de la regresión no lineal de los datos experimentales de pH a lo largo de 24 h de fermentación, utilizando tres diferentes salivas artificiales. Se muestran los valores medios de dichos parámetros y el error estándar del conjunto de datos de los mismos. En los casos que se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) se aplicó el test de Mann-Whitney, indicándose con letras diferentes en cada fila.

Parámetro	Sustrato	Saliva artificial			EE ⁶	p _{Kruskal-Wallis}
		SA01e	SA02	SA03		
VpH	con	0,857	0,873	0,803	0,0376	0,6689
	sin	1,16E ⁻⁰⁷	7,02E ⁻⁰⁷	9,46E ⁻⁰⁸	0,0109	0,1326
FAS	con	-0,2996 ^a	-0,1521 ^b	-0,1087 ^b	0,0311	0,0390
	sin	0,6020	0,5169	0,5673	0,8328	0,2521
pHf	con	4,82 ^a	5,15 ^b	5,48 ^c	0,106	0,0015
	sin	5,54 ^a	5,97 ^b	6,20 ^c	0,096	<0,0001

Notas: ¥ Identificación de las salivas artificiales: SA01e= Saliva artificial original a la que se eliminaron los carbonatos y bicarbonatos; SA02= Saliva artificial adaptada de Tung & Kung, 1993; SA03= Saliva artificial modificada de Duncan et al, 2003; § EE=Error Estándar; £ están tabulados los valores “p” reales de los correspondientes tests de Kruskal-Wallis. En aquellos casos en que fueron encontraron diferencias significativas se identificaron los tratamientos con diferencias con letras diferentes en superíndice.

Tabla XIII. Experimento 4. Comparación de los valores de los parámetros **VpH**, **FAS** y **pHf**, obtenidos de la regresión no lineal de los datos experimentales de pH a lo largo de 24 h de fermentación, en pares con y sin sustrato, utilizando tres diferentes salivas artificiales. Se muestran los valores medios de dichos parámetros y el error estándar de los mismos. En los casos que se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) se indicó con un asterisco en cada fila.

Parámetro	Saliva artificial	Sustrato		EE	p _{Mann-Whitney}
		con	sin		
VpH	SA01e	0,857	1,16E ⁻⁰⁷	0,2074	0,0809
	SA02	0,873	7,02E ⁻⁰⁷	0,1956	0,0809
	SA03	0,803	9,46E ⁻⁰⁸	0,1763	0,0008*
FAS	SA01e	-0,2996	0,6020	0,1969	0,0002*
	SA02	-0,1521	0,5169	0,1399	0,0809
	SA03	-0,1087	0,5673	1,1740	0,6625
pHf	SA01e	4,82	5,54	0,177	0,0765
	SA02	5,15	5,97	0,182	0,0270*
	SA03	5,48	6,20	0,170	0,0127*

Efecto modulador de cuatro aditivos sobre el descenso del pH

En las Figuras 9 y 10 se ilustra la evolución del pH de todos los tratamientos durante 24 h de fermentación.

Al inicio del experimento (0 h) sólo MAL09 y MAL15 mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control, siendo todos los tratamientos con ácido málico de menor pH que el control.

A las cuatro horas, todos los aditivos tuvieron al menos una dosis con pH significativamente mayor al del control (todos los tratamientos SCI, INU03, todos los tratamientos SOR; $p < 0,05$) y hubo un tratamiento (MAL15) que tuvo un pH significativamente menor ($p < 0,05$) al del control.

A las doce horas, el pH de SCI09 y SCI15 fueron significativamente mayores al control ($p < 0,05$) y MAL15 significativamente menor que el control.

Al final del experimento (24 h), solamente el pH de SOR09, SOR15, MAL09 y MAL15 fue significativamente inferior al del control.

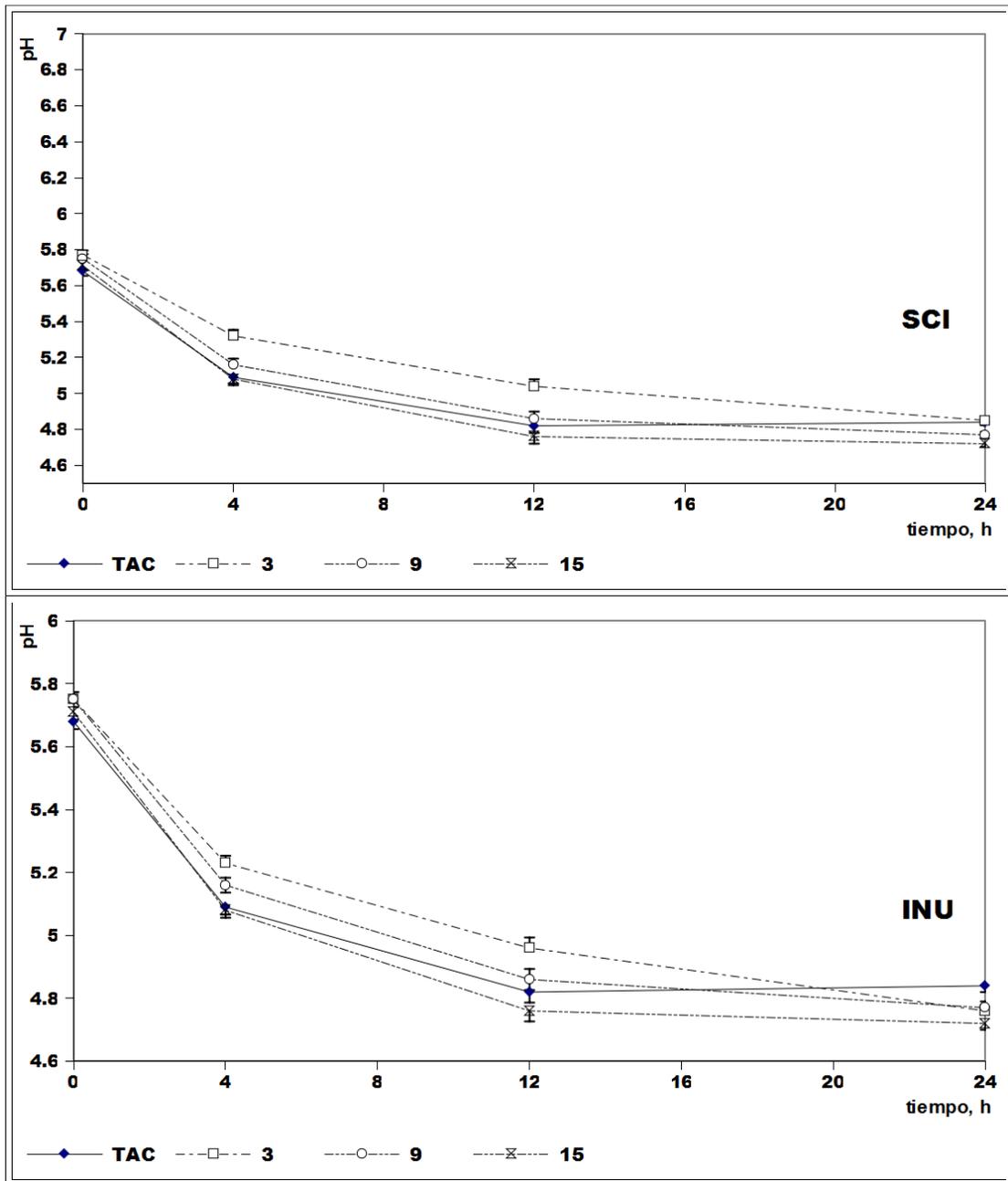


Figura 9. Experimento 4. Evaluación del pH a lo largo de 24 h de fermentación con la saliva artificial SA01e. Se muestran los tratamientos experimentales con los aditivos SCI (levadura inactivada) e INU (inulina) incluidos en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. En cada gráfica se incluye el tratamiento control (TAC). En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar.

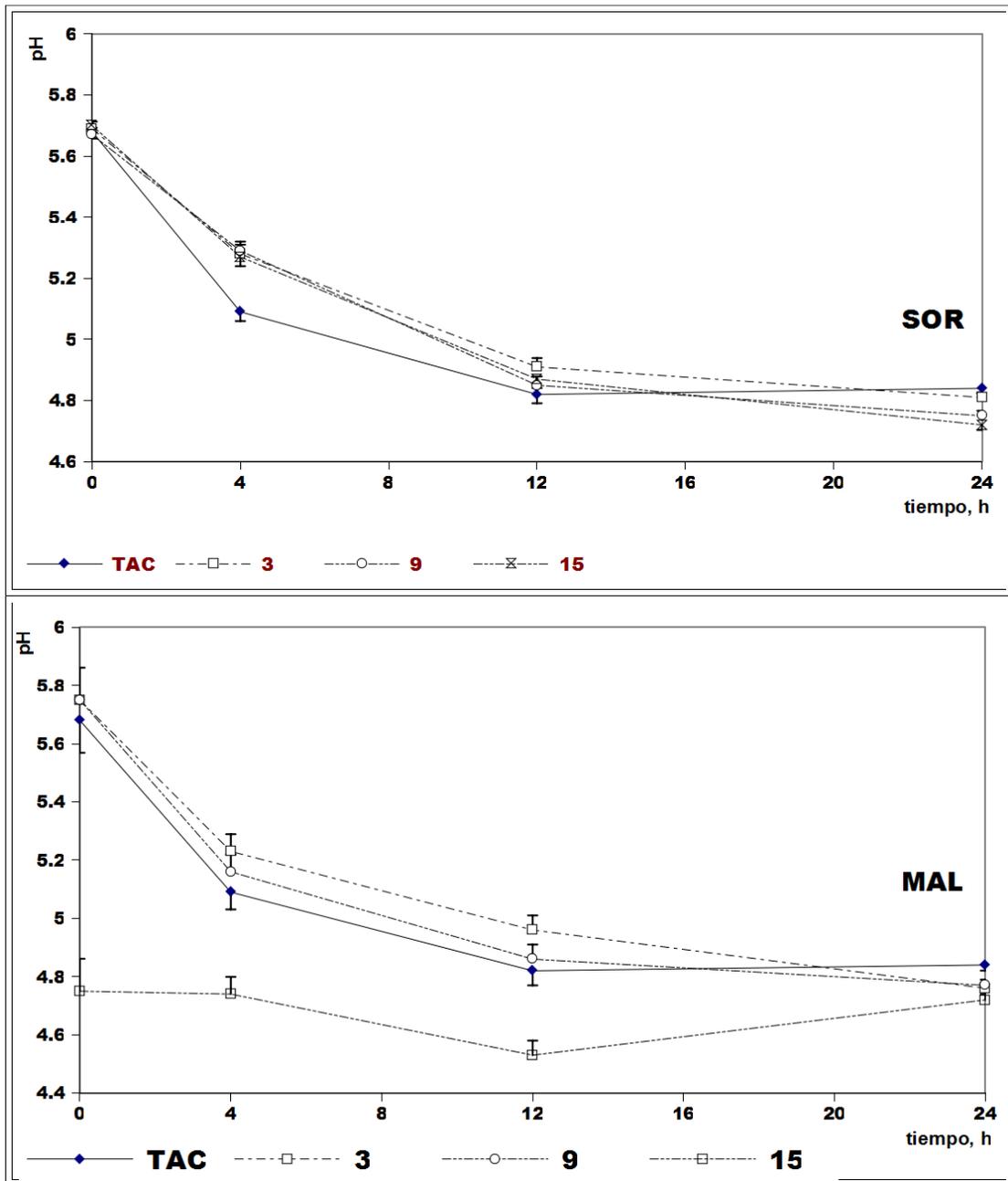


Figura 10. Experimento 4. Evaluación del pH a lo largo de 24 h de fermentación con la saliva artificial SA01e. Se muestran los tratamientos experimentales con los aditivos SOR (sorbitol) e MAL (ácido málico) incluidos en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. En cada gráfica se incluye el tratamiento control (TAC). En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar.

Analizando los parámetros de las regresiones no lineales realizadas, no se encontraron diferencias significativas en **VpH**, excepto en MAL09 y

MAL15 ($p < 0,05$, ver Tabla XIV).

En el caso de **FAS**, los tratamientos SOR09 y SOR15 fueron los únicos que mostraron diferencias significativas con el control ($p < 0,05$, ver Tabla XIV).

Finalmente, para **pHf**, ningún tratamiento tuvo diferencias significativas ($p > 0,05$) con el control.

Todos los tratamientos llegarían potencialmente al mismo valor de pH, pero algunos tendrían un valor inicial diferente (MAL09, MAL15) o lo harían a velocidades diferentes (SOR09, SOR15)

Tabla XIV. Experimento 4. Análisis de los valores de los parámetros VpH, FAS y pHf, obtenidos de la regresión no lineal de los datos experimentales de pH. Se muestran los valores medios de dichos parámetros y el error estándar del conjunto de datos de los mismos.

Parámetro	Aditivo*	Dosis				EE§	p _{ANOVA} £
		0*	3	9	15		
VpH	SCI	0,857	0,915	0,827	0,824	0,027	0,3741
	INU	0,857	0,962	0,963	0,989	0,025	0,7662
	SOR	0,857	0,909	0,980	1,024	0,032	0,5518
	MAL	0,857 ^a	0,801 ^a	0,414 ^b	0,125 ^b	0,097	0,0005
FAS	SCI	-0,300	-0,148	-0,149	-0,160	0,0234	0,0642
	INU	-0,300	-0,171	-0,226	-0,255	0,0178	0,1032
	SOR	-0,300 ^a	-0,159 ^b	-0,139 ^b	-0,137 ^b	0,0218	0,0237
	MAL	-0,300	-0,121	-0,184	-0,226	0,0245	0,1036
pHf	SCI	4,82	4,84	4,91	4,91	0,034	0,4605
	INU	4,82	4,78	4,78	4,72	0,024	0,8175
	SOR	4,82	4,79	4,7	4,67	0,025	0,3133
	MAL	4,82	4,72	4,72	4,63	0,028	0,2808

*Notas: * Identificación de los aditivos: SCI=levadura inactivada, INU=inulina, SOR=sorbitol, MAL=ácido málico; * la dosis identificada como 0% en todas las filas, corresponde al tratamiento control (TAC); § EE=Error Estándar; £ están tabulados los valores "p" reales de los correspondientes Análisis de Varianza (ANOVA), se consideran diferencias significativas cuando el valor de $p < 0,05$ y aquellos tratamientos que muestran diferencias significativas (HSD de Tukey) entre si están marcados con letras superíndices diferentes.*

Experimento 5

Este experimento fue la síntesis de todos los anteriores, tuvo una duración de 24 h y se empleó una saliva artificial seleccionada en el experimento 4. Además se agregó un tratamiento experimental (malato de sodio: MDS) a partir de uno que ya se usaba (MAL), el cual por su

naturaleza ácida tuvo un efecto directo sobre el pH. A lo largo del experimento se midieron las variables pH y producción de gas y hacia el final se tomaron muestras para determinar ácidos grasos volátiles.

Producción de gas

En las Figuras 11, 12 y 13 se muestra la producción de gas de las unidades experimentales a lo largo de 24 h utilizando la saliva artificial SA03 con tratamientos que simulaban acidosis ruminal (TAC) y tratamientos con cinco diferentes aditivos (SCI = levadura inactivada; INU = inulina; SOR = sorbitol; MAL = ácido málico; MDS = malato de sodio), cada uno de ellos en tres dosis (3, 9 y 15% de la MS del sustrato).

Desde el inicio del experimento y hasta las 12 h, SCI tuvo una mayor producción de gas que el control ($p < 0,05$) a la mayor dosis (15 %) y desde las 4 h hasta las 12 h a la dosis de 9%. A la menor dosis (3%), no tuvo diferencias significativas con el control ($p > 0,05$) en el transcurso de todo el experimento (Figura 11).

INU, mostró una producción de gas significativamente mayor que TAC ($p < 0,05$) a las 4 y a las 6 h en todas las dosis y mantuvo dichas diferencias hasta las 10 h en las dosis mayores (9 y 15%). Ver Figura 11.

SOR, tuvo diferencias significativas (mayor producción de gas) con TAC ($p < 0,05$) sólo a las 8 h y sólo al 9% (Figura 12).

Por otra parte, MAL sólo tuvo diferencias significativas con TAC ($p < 0,05$) a las 2 h de iniciado el experimento, a la dosis de 3%, pero con una menor producción de gas (Figura 12).

Finalmente MDS exhibió significativamente mayor producción de gas que el control ($p < 0,05$) durante todo el experimento en las dosis de 9% (excepto a las 2 h) y 15%. La dosis menor (3%) tuvo un comportamiento variable aunque fue siempre de un valor mayor que el control (Figura 13).

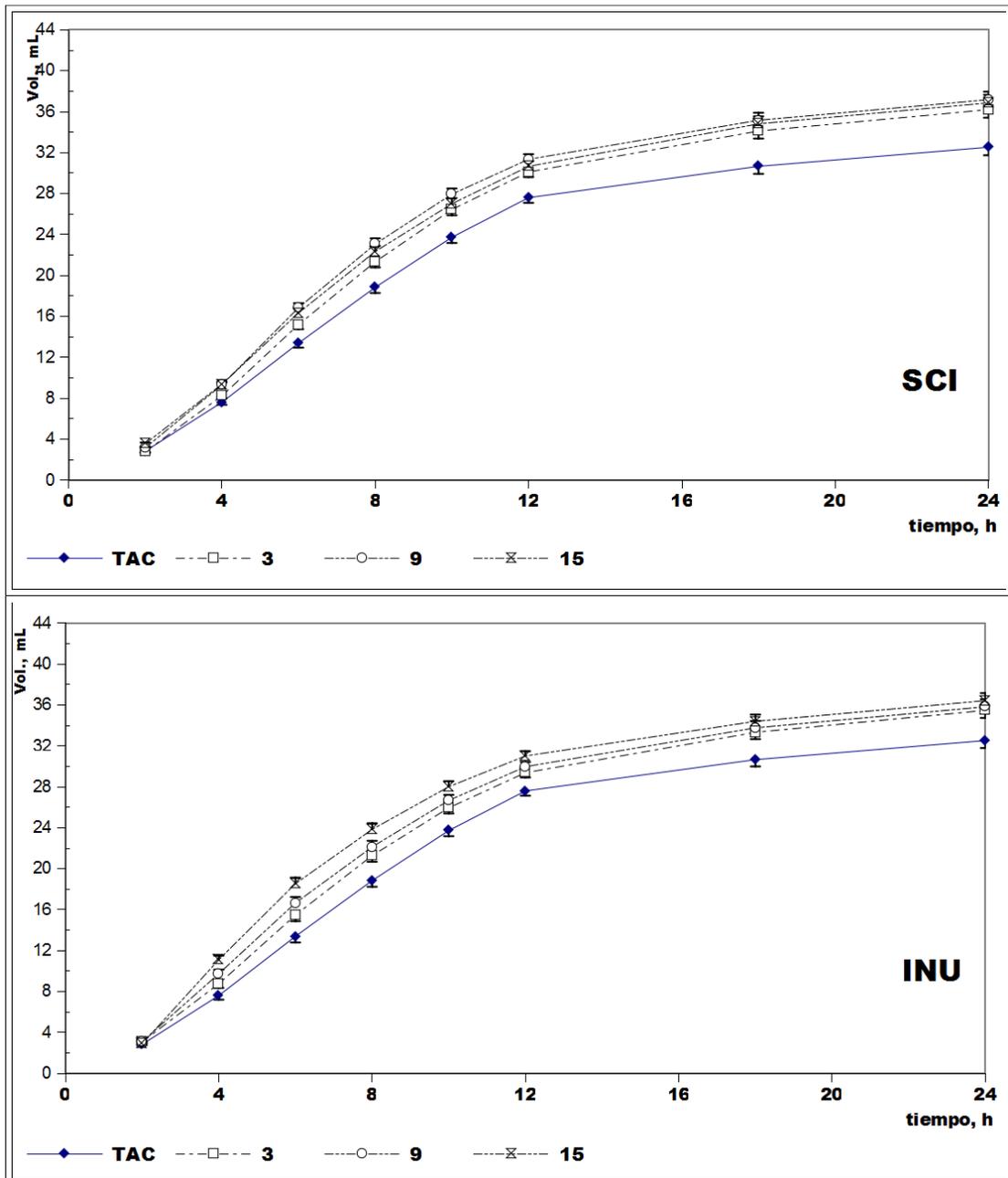


Figura 11. Experimento 5. Evolución de la producción de gas a lo largo del experimento (24 h). Cada gráfica incluye las tres dosis de cada aditivo testado además del tratamiento control. En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar. **Identificación de los tratamientos:** TAC=tratamiento control; SCI03, SCI09, SCI15: levadura inactivada al 3, 9 y 15%; INU03, INU09, INU15: inulina al 3, 9 y 15 %

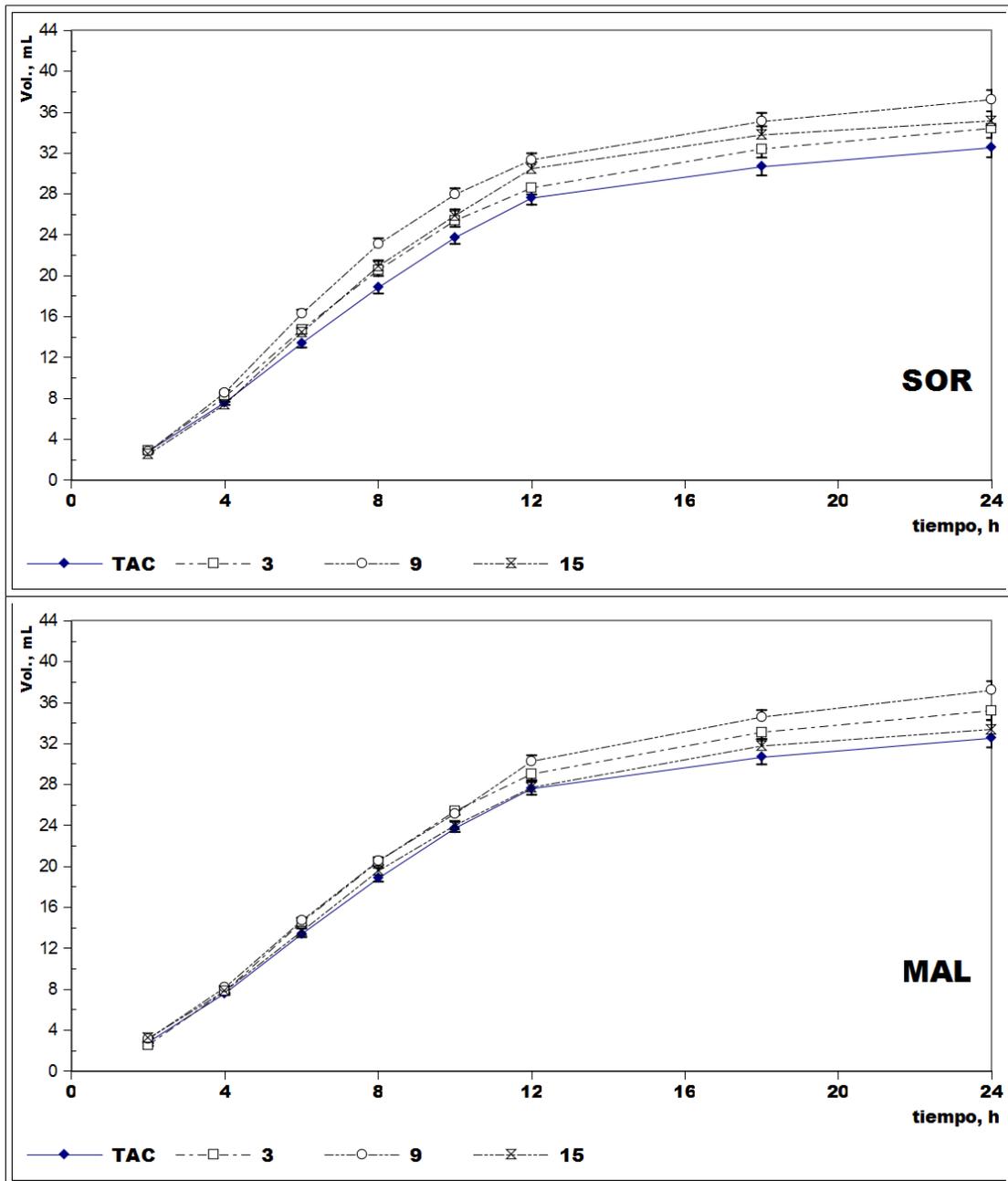


Figura 12. Experimento 5. Evolución de la producción de gas a lo largo del experimento. Cada gráfica incluye las tres dosis de cada aditivo testado además del tratamiento control. En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar. **Identificación de los tratamientos:** TAC=tratamiento control; **SOR03, SOR09, SOR15:** sorbitol al 3, 9 y 15%; **MAL03, MAL09, MAL15:** ácido málico al 3, 9 y 15 %

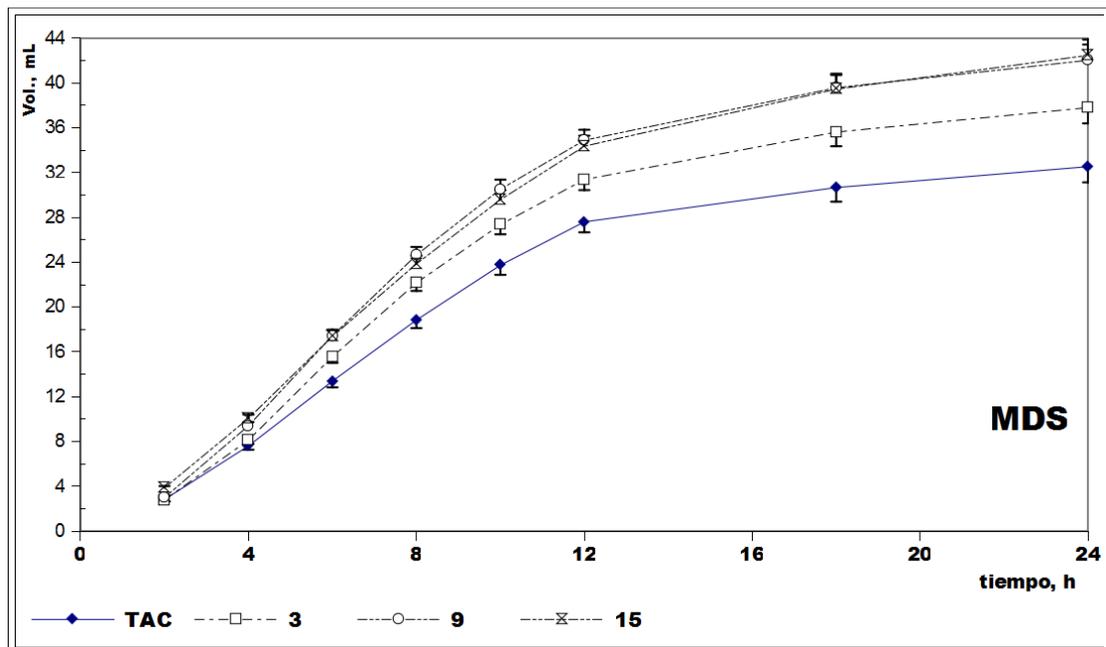


Figura 13. Experimento 5. Evolución de la producción de gas a lo largo del experimento. Cada gráfica incluye las tres dosis de cada aditivo testado además del tratamiento control. En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar. **Identificación de los tratamientos:** TAC=tratamiento control; MDS03, MDS09, MDS15: ácido málico al 3, 9 y 15 %

En el análisis de los parámetros obtenidos de las regresiones no lineales practicadas, se encontró que **pVI** y **m** no exhibieron diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto al control (TAC) para ninguno de los aditivos en ninguna de las dosis ensayadas. En cambio, **VPM** mostró diferencias significativas ($p < 0,05$), exclusivamente entre MDS al 15% y TAC (ver Tabla XV).

La producción de gas sería similar entre todos los tratamientos, pero las unidades experimentales con MDS tendrían mayor producción potencial de gas y significativamente mayor en la dosis de 15 %.

Tabla XV. Experimento 5. Comparación de los valores de los parámetros VPM, pVI y m, obtenidos de la regresión no lineal de los datos experimentales de producción de gas, mediante ANOVA. Se muestran los valores medios de dichos parámetros y el error estándar del conjunto de datos comparados.

Parámetro	Aditivo [¥]	Dosis				EE [§]	p _{ANOVA} [£]
		0*	3	9	15		
VPM	SCI	35,56	39,29	39,64	39,74	0,852	0,2993
	INU	35,56	38,21	38,02	37,38	0,797	0,7161
	SOR	35,56	37,17	39,77	38,50	1,125	0,6595
	MAL	35,56	38,37	41,56	36,83	1,203	0,3485
	MDS	35,56 ^a	41,20 ^a	45,66 ^{a,b}	46,88 ^b	1,702	0,0374
pVI	SCI	1,224	1,24	1,25	1,213	0,006	0,1983
	INU	1,224	1,225	1,235	1,281	0,010	0,1352
	SOR	1,224	1,235	1,270	1,266	0,010	0,3931
	MAL	1,224	1,238	1,189	1,203	0,008	0,1592
	MDS	1,224	1,243	1,244	1,184	0,010	0,2043
m	SCI	0,123	0,126	0,137	0,128	0,003	0,5960
	INU	0,123	0,128	0,137	0,157	0,005	0,0918
	SOR	0,123	0,128	0,137	0,129	0,004	0,8232
	MAL	0,123	0,123	0,109	0,119	0,004	0,5469
	MDS	0,123	0,124	0,125	0,113	0,004	0,7548

Notas: ¥ Identificación de los aditivos: SCI=levadura inactivada, INU=inulina, SOR=sorbitol, MAL=ácido málico, MDS=malato de sodio; * la dosis identificada como 0% en todas las filas, corresponde al tratamiento control (TAC); § EE=Error Estándar; £ están tabulados los valores "p" reales de los correspondientes Análisis de Varianza (ANOVA), se consideran diferencias significativas cuando el valor de $p < 0,05$ y aquellos tratamientos que muestran diferencias significativas (HSD de Tukey) entre si están marcados con letras superíndices diferentes.

Evolución del pH

En las Figuras 14, 15 y 16 se muestra la evolución del pH a lo largo de 24h utilizando la saliva artificial SA03 con tratamientos que simulaban acidosis ruminal (TAC) y tratamientos con cinco diferentes aditivos (SCI = levadura inactivada; INU = inulina; SOR = sorbitol; MAL = ácido málico; MDS = malato de sodio), cada uno de ellos en tres dosis (3, 9 y 15% de la MS del sustrato).

El pH de las unidades experimentales con el aditivo SCI, fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que el de TAC a las 4 h (9 y 15%) y a las 12 h (15%). En el resto de los casos mostró valores mayores que TAC aunque sin llegar a ser significativa su diferencia ($p > 0,05$) (Figura 14).

En el caso de INU, sólo en la dosis menor (3%) tuvo diferencias significativas con TAC ($p < 0,05$) con un valor mayor y sólo a las 4 h. En los demás casos no tuvo diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figura 14).

Para SOR, sólo se encontró diferencias significativas con TAC ($p < 0,05$), para la dosis del 15%, a las 24 h, pero con un pH menor (Figura 15).

Respecto a MAL, Los tratamientos con 9 y 15 % fueron significativamente menores que TAC ($p < 0,05$) al inicio del experimento, así como los que contenían la dosis mayor (15%) a las 4 h. Posteriormente los valores de pH se fueron haciendo cada vez más similares a los valores de TAC ($p > 0,05$) (Figura 15).

Finalmente, los tratamientos con MDS, al inicio (0 h) no mostraron diferencias con TAC ($p > 0,05$). A las 4 h, la dosis más baja mostró un pH significativamente mayor que TAC ($p < 0,05$), así como las dosis 9 y 15 % a las 12 y a las 24 h (Figura 16).

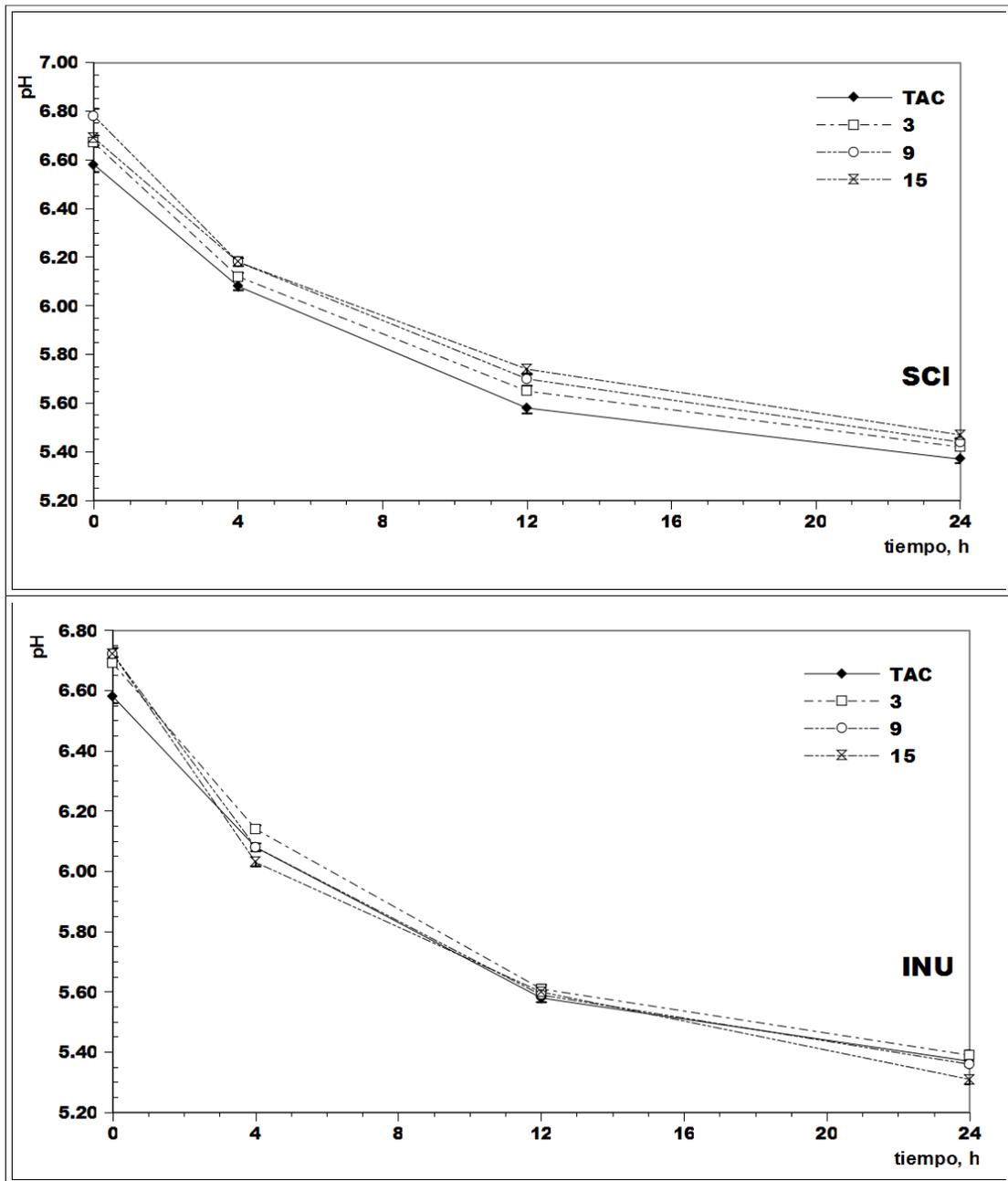


Figura 14. Experimento 5. Evaluación del pH a lo largo de 24 h de fermentación. Se muestran los tratamientos experimentales con los aditivos **SCI** (levadura inactivada) e **INU** (inulina) incluidos en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. En cada gráfica se incluye el tratamiento control (**TAC**). En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar.

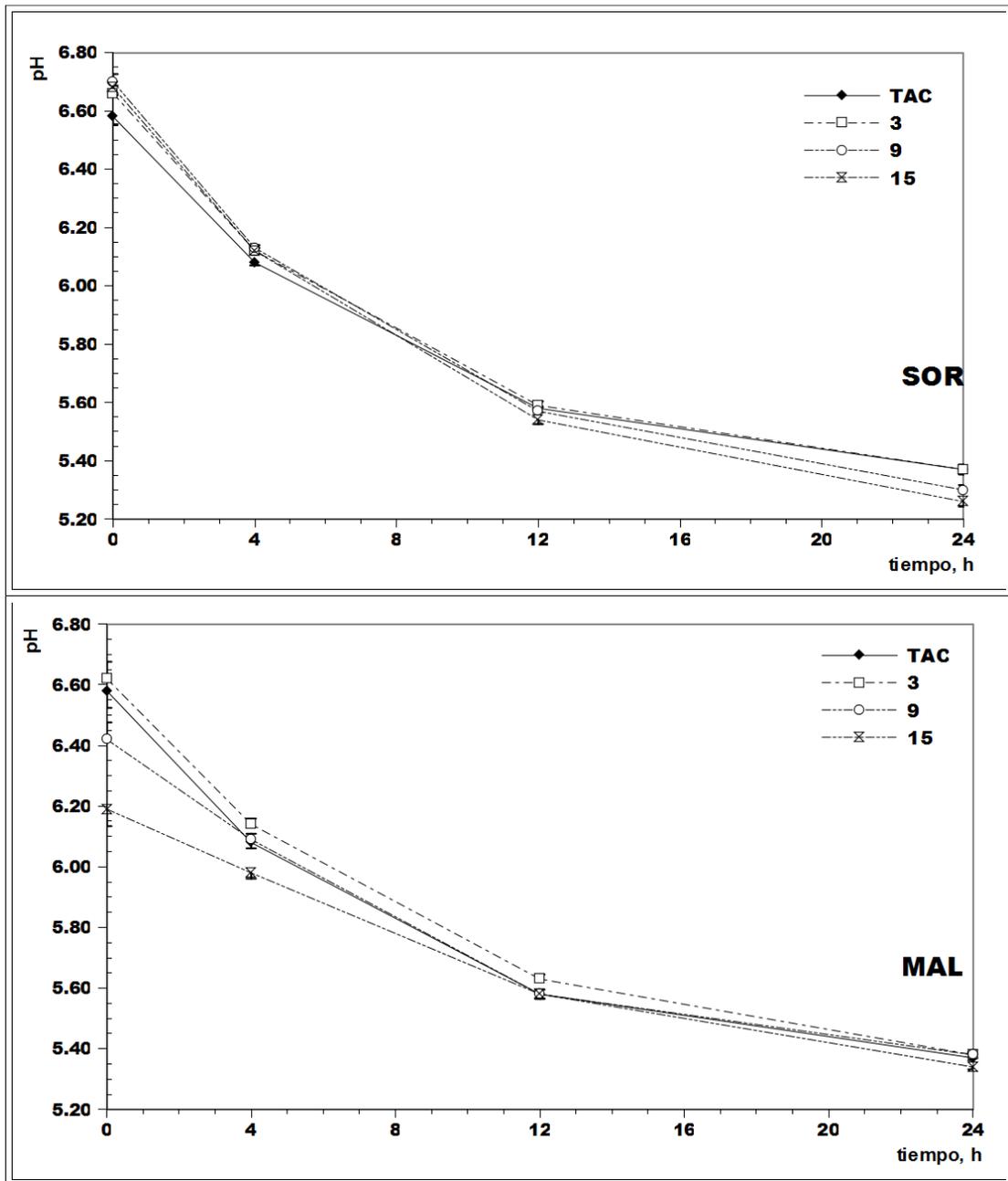


Figura 15. Experimento 5. Evaluación del pH a lo largo de 24 h de fermentación. Se muestran los tratamientos experimentales con los aditivos **SOR** (sorbitol) y **MAL** (ácido málico) incluidos en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. En cada gráfica se incluye el tratamiento control (**TAC**). En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar.

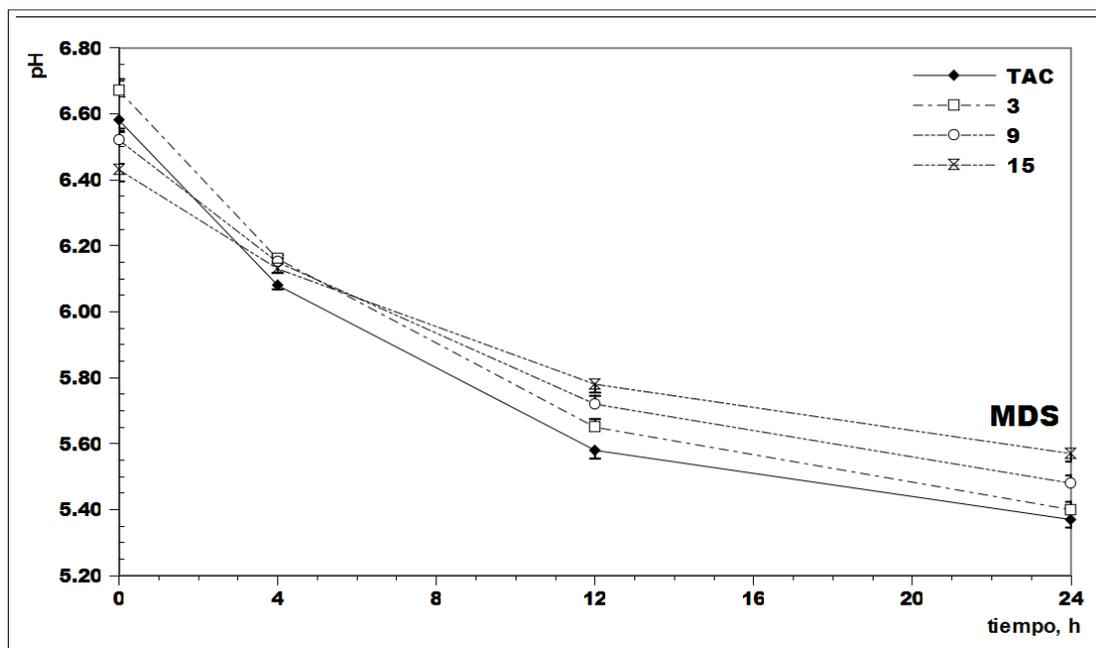


Figura 16. Experimento 5. Evaluación del pH a lo largo de 24 h de fermentación. Se muestran los tratamientos experimentales con el aditivo **MDS** (malato de sodio) incluido en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. En la gráfica se incluye el tratamiento control (**TAC**). En todas las curvas trazadas se incluye el Error Estándar.

El análisis de los parámetros de las regresiones no lineales de pH en función del tiempo, arrojaron los siguientes resultados:

El parámetro **pH_f** que expresa el valor que alcanzaría la variable pH hacia el final del experimento, mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en los tratamientos SOR15, MAL15 y MDS15 respecto al tratamiento control, pero SOR15 y MAL15 resultaron menores al control, mientras que MDS15 fue mayor (ver Tabla XVI).

Para el parámetro **VpH**, que indica la variación de la variable pH entre el inicio y el final del experimento, los tratamientos que exhibieron diferencias significativas ($p < 0,05$) con el control, fueron SOR09, SOR15; MAL15; MDS09 y MDS15 siendo sus valores: SOR15 > SOR09 > TAC > MDS09 > MAL15 > MDS15 (ver Tabla XVI).

En el caso del parámetro **FAS**, que marca la velocidad de descenso del pH, los únicos tratamientos que resultaron significativamente diferentes y además menores que el tratamiento control, fueron MAL09, MAL15, MDS09 y MDS15 (ver Tabla XVI).

Tabla XVI. Experimento 5. Comparación de los valores de los parámetros **VpH**, **FAS** y **pHf**, obtenidos de la regresión no lineal de los datos experimentales de pH, mediante ANOVA. Se muestran los valores medios de dichos parámetros y el error estándar del conjunto de datos de los mismos. En los casos que se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) se aplicó el test HDS de Tukey, indicándose con letras diferentes en cada fila.

Parámetro	Aditivo*	Dosis				EE ^s	p_{ANOVA} [£]
		0*	3	9	15		
VpH	SCI	1,275	1,295	1,371	1,284	0,0261	0,6118
	INU	1,275	1,355	1,382	1,404	0,0173	0,0539
	SOR	1,275 ^a	1,356 ^{a,b}	1,475 ^b	1,512 ^b	0,0341	0,0033
	MAL	1,275 ^{a,b}	1,328 ^b	1,181 ^{a,b}	1,100 ^a	0,0325	0,0296
	MDS	1,275 ^{b,c}	1,345 ^c	1,159 ^b	0,969 ^a	0,0461	0,0005
FAS	SCI	-0,128 ^{a,b}	-0,133 ^a	-0,135 ^a	-0,116 ^b	0,0027	0,0314
	INU	-0,128	-0,130	-0,148	-0,149	0,0047	0,2414
	SOR	-0,128	-0,131	-0,123	-0,117	0,0033	0,4912
	MAL	-0,128 ^a	-0,114 ^{a,b}	-0,099 ^b	-0,066 ^c	0,0071	<0,001
	MDS	-0,128 ^a	-0,120 ^{a,b}	-0,096 ^{b,c}	-0,094 ^c	0,0051	0,0061
pHf	SCI	5,31	5,37	5,38	5,40	0,018	0,2981
	INU	5,31	5,33	5,33	5,30	0,019	0,9325
	SOR	5,31 ^b	5,31 ^b	5,23 ^{a,b}	5,17 ^a	0,023	0,0323
	MAL	5,31 ^b	5,30 ^b	5,26 ^b	5,11 ^a	0,090	0,0006
	MDS	5,31 ^a	5,33 ^a	5,36 ^{a,b}	5,46 ^b	0,022	0,0203

Notas: Las comparaciones se muestran en filas. En los casos con diferencias significativas ($p < 0,05$), los tratamientos diferentes se identifican con letras diferentes. * El tratamiento identificado como dosis 0 corresponde al tratamiento control.

Producción de NH₃

El análisis del contenido en NH₃, medido en las unidades experimentales a las 24 h de fermentación (al final del experimento) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y el control ($p>0,05$).

Tabla XVII. Experimento 5. Contenido en NH₃ (mEq/mL) en fermentadores anaeróbicos simulando acidosis ruminal con el agregado de aditivos. Valores correspondientes al final del experimento (24 h). Se presentan los valores medios de cada tratamiento y el error estándar del conjunto de datos comparado.

Aditivo*	Dosis [§]				EE [†]	P [‡]
	0	3	9	15		
SCI	0,0039	0,0042	0,0051	0,0058	0,00037	0,32170
INU	0,0039	0,0042	0,0053	0,0035	0,00039	0,48450
SOR	0,0039	0,0030	0,0029	0,0049	0,00035	0,15090
MAL	0,0039	0,0032	0,0034	0,0026	0,00035	0,68690
MDS	0,0039	0,0024	0,0041	0,0030	0,00040	0,46340

* Identificación de los aditivos: SCI = levadura inactivada, INU = inulina, SOR = sorbitol; MAL = ácido málico, MDS = malato de sodio. § Todos los tratamientos están en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. El tratamiento control (TAC) se incluyó como dosis 0. † Error Estándar. ‡ p real del ANOVA realizado para cada ácido y cada aditivo (todas las dosis). En ningún caso hubo diferencias significativas ($p>0,05$)

Producción de AGV

El análisis del contenido en AGV medido en las unidades experimentales con 24 h de fermentación (al final del experimento), permitió detectar una mayor producción de ácido propiónico ($p<0,05$) respecto al tratamiento control para los aditivos SCI (SCI09) y MDS (MDS03, MDS15), no habiendo diferencias significativas ($p>0,05$) para los otros aditivos. Tampoco se detectaron diferencias significativas ($p>0,05$) para los demás AGV para ningún aditivo.

La relación entre ácido acético y ácido propiónico (ACE:PRO) medida a las 24 h, mostró que sólo en aquellos tratamientos con malato de sodio (MDS) hubo diferencias con el tratamiento control, siendo las dosis al 9 y al 15% MDS significativamente menores ($p<0,05$). En todos los demás casos dicha relación no fue significativamente diferente del control ($p>0,05$).

Tabla XVIII. Experimento 5. Contenido en ácidos grasos volátiles (AGV) en fermentadores anaeróbicos simulando acidosis ruminal con el agregado de aditivos. Valores correspondientes al final del experimento (24 h). Se presentan los valores medios de cada tratamiento y el error estándar del conjunto de datos comparado. Los datos están expresados en mEq/mL.

Aditivo*	Ácidos [§]	Dosis				EE [†]	p [‡]
		0	3	9	15		
SCI	ACE	0,0217	0,0264	0,0299	0,0269	0,00161	0,3830
	PRO	0,0059 ^a	0,0076 ^{a,b}	0,0095 ^b	0,0071 ^{a,b}	0,00049	0,0339
	BUT	0,0043	0,0058	0,0067	0,0059	0,00043	0,2512
	AGVt	0,0326	0,0408	0,0473	0,0410	0,00252	0,2395
INU	ACE	0,0217	0,0225	0,0230	0,0239	0,00139	0,9665
	PRO	0,0059	0,0062	0,0067	0,0080	0,00040	0,2678
	BUT	0,0043	0,0049	0,0049	0,0054	0,00035	0,8116
	AGVt	0,0326	0,0343	0,0354	0,0381	0,00212	0,8676
SOR	ACE	0,0217	0,0225	0,0196	0,0208	0,00171	0,9580
	PRO	0,0059	0,0067	0,0073	0,0076	0,00047	0,6607
	BUT	0,0043	0,0049	0,0051	0,0046	0,00040	0,9244
	AGVt	0,0326	0,0348	0,0328	0,0338	0,00052	0,9914
MAL	ACE	0,0217	0,0216	0,0212	0,0197	0,00174	0,9849
	PRO	0,0059	0,0070	0,0084	0,0080	0,00063	0,5603
	BUT	0,0043	0,0049	0,0051	0,0044	0,00042	0,9129
	AGVt	0,0326	0,0343	0,0355	0,0328	0,00270	0,9853
MDS	ACE	0,0217	0,0305	0,0233	0,0254	0,00179	0,3710
	PRO	0,0059 ^a	0,0103 ^b	0,0087 ^{a,b}	0,0111 ^b	0,00068	0,0076
	BUT	0,0043	0,0066	0,0051	0,0065	0,00044	0,1635
	AGVt	0,0326	0,0484	0,0380	0,0440	0,00279	0,2044

* Identificación de los aditivos: SCI = levadura inactivada, INU = inulina, SOR = sorbitol; MAL = ácido málico, MDS = malato de sodio. Todos los tratamientos están en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. El tratamiento control (TAC) se incluyó como dosis 0. § Identificación de los ácidos grasos volátiles: ACE = ácido acético, PRO = ácido propiónico, BUT = ácido butírico, AGVt = ácidos grasos volátiles totales. † Error Estándar. ‡ p real del ANOVA realizado para cada ácido y cada aditivo (todas las dosis). Aquellos tratamientos en la misma fila que presentan letras diferentes tienen diferencias significativas entre si (p<0,05)

Tabla XIX. Experimento 5. Relación entre Ácido acético y ácido propiónico (ACE:PRO) en fermentadores anaeróbicos simulando acidosis ruminal con el agregado de aditivos. Valores correspondientes al final del experimento (24h). Se presentan los valores medios de cada tratamiento y el error estándar del conjunto de datos comparado.

Aditivo*	Dosis				EE [†]	p [‡]
	0	3	9	15		
SCI	3,56	3,51	3,13	3,77	0,121	0,3312
INU	3,56	3,61	3,49	2,97	0,121	0,2180
SOR	3,56	3,39	2,76	2,70	0,179	0,2265
MAL	3,56	3,21	2,60	2,46	0,182	0,0831
MDS	3,56 ^b ,	2,97 ^{a,b}	2,67 ^a	2,30 ^a	0,161	0,0092

* Identificación de los aditivos: SCI = levadura inactivada, INU = inulina, SOR = sorbitol; MAL = ácido málico, MDS = malato de sodio. Todos los tratamientos están en las dosis: 3, 9 y 15 % del sustrato total. El tratamiento control (TAC) se incluyó como dosis 0.

† Error Estándar.

‡ p real del ANOVA realizado para cada ácido y cada aditivo (todas las dosis).

Aquellos tratamientos en la misma fila que presentan letras diferentes tienen diferencias significativas entre si (p<0,05)

DISCUSIÓN

El conjunto de los experimentos realizados en este trabajo buscó adaptar la técnica de fermentación *in vitro* para estudiar la acidosis ruminal. Esto implicó dos desafíos, encontrar una variable que resultara fiel a la hora de estudiar la simulación de dicha patología y evaluar el efecto potencial de sustancias que otros investigadores encontraron útiles para prevenir la acidosis ruminal (Fontenot & Huchette, 1993; Carro & Ranilla, 2003; Martin, 2005; Vyas et al, 2013).

Diversos autores han trabajado en modelos *in vitro* estudiando la funcionalidad ruminal midiendo, entre otras variables, el pH (Martin & Nisbet, 1990; Nisbet & Martin, 1991; Callaway & Martin, 1996; Martin, 1998). No se han realizado estudios que simularan una acidosis ruminal de manera similar a como se da *in vivo*, producida por la actividad de la biota ruminal sobre el sustrato. En cambio se realizaron ensayos *in vitro* partiendo de una situación de acidosis provocada por la adición de ácidos al inicio de los mismos (Martin, 1998; Martin, 2004; Colombatto et al, 2007; Kozloski et al, 2008).

Medición de la producción de gas

En tres de los cinco experimentos (1, 3, 5) se midió la producción de gas como volumen de gas acumulado, en principio para evaluar la viabilidad de utilizar esta variable para estudiar condiciones como la acidosis ruminal en experimentos *in vitro* ya que esta variable es uno de los elementos centrales del método (Theodorou et al, 1995; Schofield & Pell, 1995; Mauricio et al, 1999; Rymer et al, 2005) aunque no se ha utilizado en estos casos para ello.

Lo que resultó difícil de relacionar fue, en qué medida, las variaciones de volumen de gas producido podrían asociarse con valores de pH mayores o menores, ya que una mayor producción de gas podría resultar de una mayor actividad de la biota que normalmente produce AGV (Russell & Wallace, 1997) y esa mayor cantidad de ácidos haría descender el pH. También podría vincularse la mayor producción de gas, indirectamente con mayores valores de pH ya que los microorganismos fibrolíticos son sensibles a $\text{pH} < 6,0$ (Russell & Wilson, 1996).

Numerosos autores han trabajado utilizando el método *gas-in vitro* en forma clásica, empleando la producción de gas total como variable de importancia a la hora de analizar la efectividad de los tratamientos en estudio, tanto los valores obtenidos como los parámetros obtenidos de su modelizado (Blümmel & Ørskov, 1993; Getachew, 1998; Britos et al, 2005; Senger et al., 2007; Akinfemi et al, 2009; Antolín et al, 2009; Amer et al, 2012). Esta variable representaría la eficiencia de la biota ruminal para utilizar el sustrato, por lo que a mayor producción de gas habría mayor actividad microbiana que convertiría el sustrato en nutrientes utilizables por los rumiantes (Rymer et al, 2005).

Desde la perspectiva de la evolución de la fermentación tal como se

desarrolló en nuestros experimentos, la producción de gas podría tener la misma causa, pero también podría estar asociada a una mayor actividad de biota amilolítica (buena parte del sustrato fue almidón fácilmente disponible) en cuyo caso la producción de gas estaría acompañada por una mayor producción de ácidos grasos volátiles y de ácido láctico (Russell & Wallace, 1997). También podría ocurrir que una mayor producción de AGV con predominancia de propiónico, frecuente cuando se usan sustratos con abundancia de hidratos de carbono solubles (Russell & Wallace, 1997) podría asociarse con menor producción de gas, ya que la mayor producción de propiónico conlleva menor producción de metano y por lo tanto menos gas acumulado.

Debido a ello, sería muy difícil establecer que una mayor producción de gas pudiera traducirse en una mejor performance, al menos desde la perspectiva de lo que se pretende estudiar, relacionado con la acidosis ruminal.

También se pretendió estudiar el posible efecto de sustancias que podrían actuar como prebióticos, tendrían sobre esta acidosis simulada, moderando o no el descenso de pH que sería esperable. No se encontró literatura que haya registrado la producción de gas para estudiar la acidosis ruminal *in vitro* ni del efecto de sustancias agregadas para afectarla. En cambio Kozloski et al (2008) practicaron modificaciones de pH al inicio de la fermentación de varios sustratos, registraron la producción de gas y la analizaron ajustándola a un modelo logístico con la comparación de los parámetros obtenidos de manera similar a como se realizó en nuestro trabajo. Estos investigadores encontraron que el valor inicial del pH afectó la tasa de producción de gas (parámetro similar al denominado "m" en el presente trabajo) y el volumen total de gas (parámetro equivalente al nuestro "VPM") en pasturas templadas y afectó en menor medida el tiempo lag (relacionado con el parámetro "pVI" de nuestro trabajo). Sin embargo no le atribuyen a las variaciones en los parámetros descriptos una relación con el pH a lo largo de la fermentación. Cabe reiterar que en nuestros ensayos se simuló la instalación de una acidosis ruminal a diferencia del realizado por Kozloski et al (2008), quienes iniciaron sus ensayos con valores de pH bastante más bajos.

En el Experimento 3, se estudió adicionalmente, el efecto de diferentes condiciones de tamponamiento (salivas artificiales) sobre la producción de gas, evidenciándose una clara diferencia entre dos grupos de salivas artificiales. En las tres de mayor producción de gas, las salivas artificiales tenían mayores proporciones de bicarbonato que las salivas empleadas en los otros tres tratamientos (ver Tabla II). Ello podría explicarse por un aporte adicional de CO₂ a los primeros tres tratamientos. Un hecho similar fue reportado por Beuvink & Spoelstra (1992), quienes atribuían a los bicarbonatos incluidos en los sistemas buffer un incremento de la producción de CO₂.

Los tres experimentos (1, 3 y 5) tuvieron duraciones diferentes, 96, 18 y 24 h respectivamente y se realizaron en diferentes condiciones de tamponamiento. En todos los casos el modelo elegido ajustó bien y permitió

observar diferencias entre los tratamientos experimentales.

Para poder explicar el comportamiento general de los fermentadores, de acuerdo con el modelo elegido (ver ecuación 2), podría pensarse que se habrían alcanzado un volumen potencial máximo (VPM) en cada experimento hacia el final de los mismos, pero no todos los tratamientos experimentales lo habrían hecho a la misma velocidad (m) y desde un punto de partida diferente en cuanto a volumen producido (pVI). Los tratamientos con los aditivos usados mostraron diferencias en los parámetros de este modelo expresándose mayores variaciones en el Experimento 5 que en Experimento 1, posiblemente influidos por el empleo de una saliva artificial diferente (con menor capacidad de tamponamiento). En el Experimento 5, todos los tratamientos experimentales indujeron una mayor producción de gas (VPM) respecto a TAC aunque hubo pocos que tuvieron una producción significativamente mayor, mientras que en el Experimento 1 todos los tratamientos experimentales tuvieron similar producción de gas (incluyendo a TAC).

El aditivo SCI mostró efectos variables entre ambos experimentos sobre la producción de gas, aunque los tratamientos experimentales con SCI se diferenciaron de TAC, con mayor producción, en el Experimento 5. Podría suponerse que el menor nivel de tamponamiento permitió que este aditivo indujera en algunos miembros de la biota presente en el líquido ruminal la producción de mayores cantidades de gas; Rossi et al (2004) y Meissner et al (2014) encontraron un efecto de SCI sobre el desarrollo de *Megasphaera elsdenii* que usaría lactato como fuente de energía y entonces produciría mayor volumen de gas.

El aditivo INU mostró efectos ambiguos variando el patrón de producción de gas respecto a TAC por lo que no se podía afirmar que esta sustancia actúa de alguna manera sobre la biota ruminal. Zhao et al (2014) encontraron trabajando *in vitro* con un sistema de fermentación continuo RUSITEC que la inulina inducía la producción de mayor cantidad de butirato y menos acetato comparado con almidón, también observaron un efecto inhibitorio sobre *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens* así como una reducción de la producción N de síntesis bacteriana. Por otra parte Öztürk (2009) demostró previamente, también utilizando el sistema RUSITEC, que la inulina estimulaba la fermentación ruminal y reducía la concentración de NH₃. Sin embargo ello no explicaría los fenómenos que se encontraron ni en el Experimento 1 ni en el Experimento 5 en cuanto a producción de gas, salvo que una mayor actividad podría interpretarse como una potencial mayor producción de gas.

El aditivo SOR no mostró efectos definidos, en ninguno de estos experimentos, sobre la producción de gas. Por ello no podría establecerse un patrón de acción de esta sustancia. Tampoco se encontró en la literatura científica una explicación sobre sus posibles efectos sobre la biota ruminal.

El aditivo MAL produjo efectos diferentes en la producción de gas en los experimentos 1 y 5. Mientras que en el primero que tenía una saliva artificial con mayor efecto tamponante produjo una cantidad similar de gas que TAC

pero a un ritmo más lento, en el Experimento 5, que tenía una saliva artificial con menor poder tamponante, los tratamientos con MAL produjeron más cantidad de gas que TAC. Podría pensarse que el ácido málico, por su naturaleza química y en un sistema con poca amortiguación del pH, afectaría al menos a algunos microorganismos presentes en el líquido ruminal (Russell, 1987; Russell & Wallace, 1997) y enlentecería o disminuiría la producción de gas. Podría pensarse que en el Experimento 1, de más larga duración (96 h) y con una saliva artificial de mayor poder tampón, la biota presente en los fermentadores se iría adaptando al nuevo ambiente y aquellos microorganismos capaces de utilizar el ácido málico (Russell & Wallace, 1997; Martin, 2005) producirían un aumento del pH haciendo que el medio resultase más favorable para aquellos miembros más sensibles del ecosistema (Russell & Wilson, 1996). Sin embargo fue una fermentación con un más pronunciado descenso del pH la que logró mayores volúmenes de gas. Partiendo del argumento de los autores mencionados sobre la utilización que harían algunos miembros de la biota presente en el líquido ruminal del lactato producido por otros microorganismos ruminales, no parecería que el menor pH los afectase notoriamente.

El aditivo MDS indujo claramente una mayor producción de gas de la observada en TAC. Esto sería consistente con lo reportado por Nisbet & Martin (1993) quienes en estudios *in vitro* encontraron que el malato agregado en un medio con líquido ruminal y con lactato presente estimulaba el desarrollo de *Selenomonas ruminantium*, microorganismo que se podría hacer predominante y utilizaría el lactato como fuente de energía e incrementaría la producción de CO₂ (que es un metabolito de la fermentación de lactato a propionato), lo que además de incrementar el volumen de gas podría contribuir con el tamponamiento del medio. Por otra parte Carro & Ranilla (2003) encontraron en estudios *in vitro* que el malato tuvo un efecto de reducción en la producción de CH₄, lo cual iría en contra de una mayor producción de gas y estaría en discrepancia con nuestros hallazgos

Medición del pH, de los AGV y del NH₃

Excepto en el primer experimento, diseñado como primera aproximación de uso de este método para adaptarlo a las condiciones de acidosis ruminal simulada, en los cuatro restantes se realizó la medición del pH de los fermentadores. Esta variable parece ser más apropiada para estudiar la acidosis ruminal ya que en todos los ensayos (*in vivo* e *in vitro*) relacionados con la patología y aún otros que persiguen otros objetivos ha sido la medida de elección (Sauvant et al., 1999; Enemark et al., 2004; Martin, 2004; AlZahal et al., 2007; Durmic et al., 2012; Kleen & Cannizzo, 2012). Asimismo el pH es la medida práctica para decidir si un animal sufre o no de acidosis (Sauvant et al., 1999; Keunen et al., 2003; Krause & Combs, 2003), por lo que era de elección para este trabajo.

En tres de los cuatro experimentos (Exp 2, 4 y 5) se testaron los aditivos (SCI, INU, SOR, MAL, MDS) buscando un posible efecto moderador de la acidosis ruminal, simulada en la tratamiento TAC, aunque los tres

experimentos se realizaron con diferentes salivas artificiales las que variaban en su capacidad de tamponamiento. Normalmente en los experimentos de producción de gas *in vitro* se suele usar salivas artificiales con un gran poder tamponante ya que el objetivo es medir directa o indirectamente el volumen de gas producido y una duración más prolongada es necesaria (Beuvink & Spoelstra, 1992; Kozloski et al., 2008; Elghandour et al, 2013). En nuestro trabajo resultó más conveniente una menor capacidad de amortiguación del pH para permitir registrar si las sustancias utilizadas tenían algún efecto por el que actuando sobre la biota ruminal presente en los fermentadores, ésta modificaría el pH disminuyendo el descenso e incluso incrementando el valor de esta variable.

En ensayos *in vitro* de corta duración (24 - 36 h) en los que se procuró simular una acidosis ruminal en progreso, los efectos moderadores sobre el pH que tendrían cierta utilidad, deberían observarse entre las 4 y 12 h, pudiendo prolongarse hasta su finalización. Podría decirse, entonces que estarían exhibiendo un efecto preventivo.

El aditivo SCI mostró efectos moderadores del pH en las dosis mayores entre las 12 y las 24 h, evidenciándose mejor en los fermentadores con menor tamponamiento. Vyas et al. (2014) encontraron en un experimento *in vivo* que *Saccharomyces cerevisiae* autoclavado tuvo un efecto sobre el pH en vaquillonas de carne con acidosis ruminal subaguda elevando su valor y mejorando algo su condición. Sin embargo, no fue posible determinar el mecanismo por el cual ocurrió y no pudo establecerse su completa eficacia.

En general el aditivo INU no mostró efecto sobre el pH en ninguno de los tres experimentos considerados. La inulina ha sido estudiada como prebiótico para su uso en animales monogástricos, cuyo efecto más importante ha sido el de estimular entre otras a bacterias ácido-lácticas (Liong & Shah, 2005; Figueroa Velasco et al., 2006, Van Loo, 2007). No obstante hay estudios con esta sustancia sobre la biota ruminal. Öztürk (2008; 2009) en estudios *in vitro* utilizando el sistema RUSITEC, encontró que el empleo de inulina no afectaba el pH ni producía cambios en los AGV, actuando solamente sobre el N-NH₃. Esto fue corroborado recientemente por Zhao et al. (2014). Ni nuestros datos ni los hallazgos de estos autores permitieron evidenciar algún efecto de la inulina sobre el pH.

El aditivo SOR exhibió efectos contradictorios, mientras en el Experimento 2 (de mayor duración y con una saliva artificial que amortiguó más el pH) se observaron efectos hacia las 36 h, en el Experimento 4 (saliva artificial con menor capacidad tamponante y una duración de 24 h) desde las 4 h y no más allá de las 12 h se observó que el pH se mantuvo por encima del control, pero ello no se reiteró en el Experimento 5 el cual tenía condiciones similares al anterior. Fontenot & Huchette (1993) en un estudio *in vivo*, encontraron que suministrar sorbitol en la terminación de ganado de feedlot tuvo efectos positivos en la eficiencia en el uso de su alimentación (ensilado y concentrados) aunque no pudieron determinar la forma de acción de esta sustancia.

El aditivo MAL tuvo en nuestros ensayos un efecto directo sobre el pH

bajándolo, dada su naturaleza ácida. Ello pudo ser percibido desde el inicio en los Experimentos 2, 4 y 5. Podría pensarse, a partir de los resultados obtenidos por investigadores cuyos trabajos *in vivo* (Kung et al, 1982; Montaña et al, 1999, De Nardi et al., 2014) que el ácido málico, mostraría un efecto sobre la biota presente en el líquido ruminal fresco utilizado que tendería a elevar el valor de pH. Esto no pudo ser comprobado en el presente trabajo posiblemente por las condiciones experimentales que facilitaban la acumulación de metabolitos ácidos e impidieron mecanismos de absorción de AGV y limitaron el tamponamiento.

El aditivo MDS se testó únicamente en el último experimento y su desempeño moderando el pH fue claramente positivo ya que no sólo redujo el descenso sino que además la dosis tuvo un efecto directo sobre dicha acción. Estos resultados serían acordes con los obtenidos por otros autores (Nisbet & Martin, 1990; Martin & Streeter, 1995; Callaway & Martin, 1996, Evans & Martin, 1997; Carro & Ranilla, 2003). Carro et al (1999) trabajando *in vitro* con un sistema RUSITEC no encontraron diferencias entre los pH de dos tratamientos experimentales (DL-malato y propionato), que arrojaron valores diarios por encima de 6,8. Más recientemente, De Nardi et al (2014) trabajando *in vivo*, tuvieron éxito empleando una mezcla fumarato-malato moderando el descenso del pH en vacas lecheras alimentadas con una dieta acidogénica. Nisbet & Martin (1993) demostraron que microorganismos como *Selenomonas ruminantium* fueron estimulados por el malato y el fumarato en un medio conteniendo lactato, utilizándolo como fuente de energía para su desarrollo. Este mecanismo podría explicar que los resultados se hicieran más evidentes a partir de las 4 h, luego de un período de adaptación de la biota ruminal en los fermentadores. Más aún, Martin (1998) destacó un mejor efecto del malato en presencia de sodio, lo que concuerda con el aditivo MDS preparado para nuestro estudio.

En la literatura científica, se encuentran reportes que describen efectos del empleo tanto de ácido málico como de malato elevando los valores de pH y en algunos casos sin hacer una distinción entre ambas sustancias. Carrasco et al (2012) demostraron *in vivo*, que la suplementación de una dieta rica en concentrados tanto con malato como con ácido málico no afectaban la funcionalidad ruminal ni modificaban el pH. Hernández et al (2011), por otra parte, estudiando el efecto que podría tener la adición de malato en la dieta de bovinos sobre variables medidas en sangre asociadas a la acidosis ruminal (L-lactato sérico), constataron que tanto el ácido málico como una mezcla de malato disódico y malato cálcico tuvieron un efecto positivo en dichas variables. En los estudios *in vitro* se ha empleado más comúnmente el malato bajo la forma de malato disódico o en combinación con malato cálcico (Nisbet & Martin, 1993, 1994; Martin & Streeter, 1995; Callaway & Martin, 1996; Evans & Martin, 1997; Martin, 2004). Nuestros resultados con el ácido málico y el malato disódico mostraron la inconveniencia del uso de ácido málico en experimentos *in vitro* y la ventaja de utilizar el malato disódico para ver efectos moderadores sobre pH ruminal.

En el Experimento 5 se obtuvieron datos de producción de ácidos grasos

volátiles a las 24 h de fermentación, con la constatación de un efecto de SCI y de MDS incrementando la producción de ácido propiónico y un efecto solamente de MDS reduciendo significativamente la relación acético:propiónico; esta relación también se redujo aunque no de manera significativa en los tratamientos con MAL. Martin (2004) comprobó en condiciones *in vitro*, que la adición de malato en fermentadores con líquido ruminal, además de producir un ascenso de pH, aumentaba la concentración de ácido propiónico y reducía la relación acético:propiónico. Este autor identificó como posibles responsables a microorganismos como *Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii*, a través de dos mecanismos bioquímicos diferentes, los cuales utilizaban el lactato a partir del estímulo del malato suministrado. Anteriormente, Nisbet & Martin (1993) habían encontrado un efecto similar en un cultivo de *Selenomonas ruminantium*, identificando el consumo de lactato estimulado por la adición de malato, fumarato y un extracto de levadura (similar al tratamiento SCI). Varios autores comprobaron, *in vitro*, que el malato es capaz de incrementar la producción de propionato y de AGV totales además de reducir la relación acético:propiónico (Martin & Streeter, 1995; Callaway & Martin, 1996; Martin et al., 1999; Carro & Ranilla, 2003) y disminuir la concentración preexistente de lactato (Nisbet & Martin, 1991; Carro & Ranilla, 2003). Por otra parte, Carro et al. (2006) encontraron que el malato agregado *in vitro* fue capaz de incrementar la producción de butirato, hecho no constatado en el Experimento 5 ni por MAL ni por MDS. Sin embargo, todos los aditivos fueron capaces de incrementar aunque no de forma significativa los niveles de ácido butírico y también incrementaron los valores de AGV totales levemente. En síntesis, el malato fue el único aditivo utilizado en nuestro trabajo que resultó capaz de incrementar a las 24 h los niveles de ácido propiónico y de los AGV totales aunque reduciendo la relación acético:propiónico, en sintonía con las investigaciones reseñadas más arriba. Por ello podría suponerse un estímulo al desarrollo de microorganismos utilizadores del lactato tales como *Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii*.

La producción de NH₃ no varió significativamente con respecto al control para ninguno de los aditivos estudiados. No fue posible tampoco encontrar una relación con el pH que pudiera explicar su variación.

Analizando los datos a partir del modelo obtenido por regresión no lineal, se pudieron establecer algunos hechos:

- Para el parámetro que representaría el pH final (pH_f, el valor más bajo) que lograrían los sistemas experimentales, dados por la acumulación de ácidos hacia el final del experimento, se observó lo siguiente: En el Experimento 2 (en el que se usó la Saliva artificial SA01 que era la de mayor poder de tamponamiento) hubo una tendencia de valores mayores al control de todos los aditivos, aunque las levaduras inactivadas en las dos dosis mayores (SCI09, SCI15) fueron las significativamente mayores ($p < 0,05$). En el Experimento 4 todos los tratamientos tuvieron valores muy bajos para este parámetro, ningún tratamiento tuvo diferencias significativas ($p > 0,05$)

aunque SCI fue el único aditivo en el que sus unidades experimentales mostraron mayores valores. En el experimento 5 pHf adoptó valores intermedios entre los de ambos experimentos anteriores; se mantuvo la tendencia de SCI de mostrar valores mayores a los del control, pero SOR15 y MAL15 fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) y el nuevo aditivo MDS fue significativamente mayor que el control ($p < 0,05$).

- El parámetro VpH, que indicaría el intervalo de pH desde el valor máximo inicial hasta el valor del parámetro anterior, marcó lo siguiente: en el Experimento 2, algunos tratamientos (INU09, INU15; SOR09, SOR15; MAL03, MAL15) indujeron menores intervalos ($p < 0,05$) que los exhibidos por el tratamiento control, es decir que el pH descendería menos. En el Experimento 4 la mayoría de los tratamientos tuvieron mayores intervalos de pH, aunque MAL09 y MAL15 fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$). En el Experimento 5 la mayoría de los tratamientos también mostraron mayores valores para este parámetro ($p > 0,05$), aunque SOR09 y SOR15 fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) y MAL15, MDS09, MDS15 fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$).
- Respecto al parámetro FAS, que marcaría la velocidad de descenso del pH, se encontró lo siguiente: En el Experimento 2 FAS fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en casi todos los tratamientos experimentales. En el Experimento 4 la velocidad de descenso del pH fue inferior en todos los casos aunque sólo los tratamientos con SOR (todas las dosis) fueron significativamente menores ($p < 0,05$). En el Experimento 5 se destacaron SCI03 y SCI09 con mayores velocidades de descenso de pH ($p < 0,05$) respecto al control y MAL09, MAL15, MDS09 y MDS15 tuvieron velocidades de descenso del pH significativamente menores ($p < 0,05$).

De acuerdo a los resultados obtenidos se podría destacar

- En el Experimento 2 los fermentadores con levadura inactivada tuvieron un descenso de pH más moderado aunque más rápido que el tratamiento control logrando valores significativamente mayores que éste.
- En el Experimento 4 lo más destacado sería que aunque todos los tratamientos llegarían potencialmente a los mismos valores de pH, los tratamientos con mayores concentraciones de ácido málico harían un menor recorrido (partiría de un menor valor inicial que el control) y que los tratamientos con sorbitol harían más rápido el descenso de pH que el control.
- Para el Experimento 5, lo más importante sería por un lado que SCI15 iniciaría y terminaría con valores de pH similares a los del control, pero lo haría en forma más lenta; por otra parte SOR09 y SOR15 llegarían a un menor valor de pH que el control a una velocidad similar probablemente desde un valor igual; en cambio los

tratamientos conteniendo ácido málico tuvieron diferentes comportamientos dependiendo de la dosis, MAL15 inició el experimento y finalizó con valores sensiblemente menores que el control pero lo hizo bastante más lentamente, MAL09 no se diferenció del control respecto a los valores iniciales y finales pero también hizo el descenso más lentamente, MAL03 no se diferenció del control; finalmente el malato de sodio mostró que inició y terminó con valores superiores de pH respecto al control y que el descenso fue más paulatino, ésto fue dependiente de la dosis ya que a la menor dosis no tuvo diferencias significativas con el control en ninguno de los parámetros con MDS09 tuvo diferencias en dos de los parámetros (VpH y FAS, $p < 0,05$) y MDS tuvo diferencias significativas en todos los parámetros ($p < 0,05$).

Viendo conjuntamente los resultados de estos tres experimentos, podría decirse que al disminuir en forma moderada el nivel de tamponamiento (Experimento 5, saliva artificial SA03) fue posible visualizar la dinámica de descenso de pH de la acidosis ruminal simulada (TAC) a la vez que el efecto modulador que ejercieron algunos aditivos (MDS, SCI).

Salivas artificiales como objeto de estudio

La saliva de los rumiantes es una fuente de sustancias amortiguadoras del pH, principalmente bicarbonato (Dijkstra et al, 2012). El agregado de soluciones con efecto tampón en los ensayos *in vitro* (salivas artificiales) tienen como objetivo permitir la fermentación en las unidades experimentales sin afectar demasiado la integridad de los microorganismos que conducen dicha fermentación.

El efecto tampón de dichas salivas artificiales es algo normalmente buscado en los experimentos *in vitro* ya que asegura la vitalidad de los microorganismos más sensibles, generalmente los fibrolíticos (Russel & Wilson, 1996). Sin embargo, en nuestro caso necesitábamos estudiar sin interferencias los cambios de pH y ello no ocurrió en el Experimento 2 ya que se empleó una saliva artificial muy potente en su capacidad tampón. Debido a ello se realizó el Experimento 3 para evaluar la posibilidad de cambiar las condiciones de tamponamiento durante la fermentación, para poder evidenciar mejor los cambios de pH, lo cual fue continuado en parte en el siguiente experimento.

Posteriormente la saliva artificial "SA01e" se empleó con el fin de mejorar el contraste entre el inicio y el final (18 h) del experimento y entre el líquido ruminal tamponado respecto al tratamiento que simulaba una acidosis ruminal. Esta saliva artificial se comparó con otras que tenían composiciones bastante diferentes (otra manufactura) en el Experimento 4. En éste se eligió la saliva "SA03" por permitir visualizar en mejores condiciones el descenso de pH producido por la acción del líquido ruminal sobre el sustrato acidogénico.

Meschy et al (2004) haciendo un meta análisis de 40 reportes de trabajos

in vivo mostraron que el uso de sustancias tampón, principalmente bicarbonato, además de tener un efecto sobre el pH, podían producir modificaciones en las relaciones entre los AGV aunque no modificaba su valor total. Cobos-Peralta et al (2005) ensayaron *in vitro* el efecto de dos sustancias tampón, entre ellas bicarbonato de sodio, que mostró la esperada amortiguación en el descenso del pH, disminuyendo además la cantidad de lactato y la relación acético:propiónico, pero incrementando los niveles de todos los AGV. Estos trabajos dan cuenta de efectos propios que tendría el bicarbonato, por lo que su uso en ensayos *in vitro* como los realizados en este trabajo interferirían con los efectos que se pretendían investigar.

Las salivas artificiales elegidas para utilizar en los Experimentos 4 y 5 (SA01e, SA03 respectivamente) resultaron apropiadas ya que al tener menor cantidad de bicarbonatos y mayor proporción de fosfatos, sería posible suponer que permitieron variaciones en el pH de los fermentadores sin interferencias. Entonces los valores obtenidos de pH se habría debido la acción de la biota ruminal y no a sustancias diferentes de los aditivos que se testaron.

Modelos matemáticos estudiados mediante regresiones no lineales

Para las variables que midieron los efectos de los experimentos realizados se buscaron modelos matemáticos relativamente sencillos de los que surgieran parámetros que pudieran sostener una explicación biológica relativamente comprensible y que funcionara en ensayos de diferente duración aunque, mayoritariamente breves.

Así, se seleccionó para la producción de gas un modelo basado en el de von Bertalanffy, el cuál ha sido empleado en muy diversas realidades biológicas (Del Valle, 1986; Parés et al, 2014) en lugar de otros que se han estudiado en relación al método de producción de gas-*in vitro*, como el modelo generalizado de Mitscherlich, el modelo generalizado de Michaelis-Menten, el de Gompertz y el Logístico (France et al, 2000; López et al, 2007), el de Ørskov (Chenost et al, 2001) y el bicompartimental (Senger et al, 2007).

Este modelo mostró un valor límite (VPM) que sería la asíntota de la curva y que se podría interpretar como el valor total que alcanzaría el sistema hacia el final del experimento. También presentó un parámetro (m) con grandes similitudes a los estudiados en otros modelos, en los que se identificó con una tasa con unidad h⁻¹. El tercer parámetro del modelo utilizado mostró semejanzas con constantes a las que se les dio menor importancia y que resultaron asociados con un período LAG o con una producción de gas prematura. Teniendo en cuenta que en nuestros experimentos siempre se restó un blanco (valores de fermentación de líquido ruminal tamponado y sin sustrato ni aditivo) y que se balanceó la posición de las unidades experimentales en los fermentadores para evitar sesgos provocados por la incubación, los valores de este parámetro podrían

deberse a la reacción del líquido ruminal con el sustrato en el breve período entre el llenado de los frascos y el comienzo de la incubación y en mucho menor medida a la atmósfera de CO₂ previa al sellado de los frascos.

Para el pH se seleccionó un modelo exponencial cuyo término independiente (parámetro pH_f) también fue el valor asintótico que representó el valor potencial mínimo de pH hacia el final de la incubación. Esto podría ser importante si en futuros experimentos se pudiera asociar el valor del parámetro a combinaciones alimento-aditivos. El parámetro denominado FAS se podría asociar con la velocidad de descenso del pH de manera similar al parámetro “m” del modelo comentado más arriba y a los de los otros modelos que se aplicaban a la producción de gas. La diferencia sustancial entre FAS y los otros mencionados fue el signo ya que todos los modelos de producción de gas eran de crecimiento y el usado para el pH fue de decrecimiento. FAS fue denominado como “factor asociado al sustrato” porque se encontró que para unidades experimentales con la misma saliva artificial, los diferentes sustratos mostraban valores diferentes y que los aditivos realmente afectaban este parámetro. Resultó útil en todos los tratamientos que simulaban acidosis ruminal, pero no en aquellos tratamientos en los que no se incluyó sustrato acidogénico. El parámetro VpH también resultó de interés ya que, dentro de los límites de los experimentos realizados indicó la cantidad de la variación del pH e indirectamente el valor inicial. No se encontró literatura que estudiara específicamente a través de modelos matemáticos la dinámica del pH en experimentos *in vitro* reproduciendo en forma simulada la instalación de una acidosis ruminal y posibles mecanismos de moderación de la misma.

En síntesis

La variable que mostró el impacto de la patología que se estudia mediante simulación *in vitro* (acidosis ruminal) fue el pH ya que coincidiría con la medida en experimentos *in vivo* y se relaciona con la ocurrencia de la patología, tanto en su forma clínica como subclínica y/o subaguda. Es razonable pensar que el pH debiera considerarse en este contexto como la medida de referencia y que las demás variables consideradas tendrían que considerarse como complementarias.

La producción de gas como variable para registrar los citados eventos podría resultar de utilidad, pero resulta difícil explicar la mayor o menor acidez resultante a través de una mayor o menor cantidad de gas producido o de la velocidad en que fuera conseguido. Para esta variable importa también tener en cuenta la duración total de los experimentos.

El agregado de aditivos afectó el comportamiento de los fermentadores, por lo que podría suponerse algún tipo de efecto modulador de la biota ruminal, destacándose MDS y en segundo lugar SCI. Se evidenció también que estos sistemas resultarían útiles para estudiar *in vitro*, problemas como la acidosis ruminal, siempre que se incluyera salivas artificiales que permitiesen cambios en el pH debidos a la actividad fermentativa y no a

ingredientes de ellas.

Los datos obtenidos de los diferentes experimentos realizados se analizaron simultáneamente en forma directa y a través de su modelización matemática, evidenciándose que algunos aditivos tuvieron una mejor performance y que la dosis de los mismos pudo influir en los distintos experimentos.

CONCLUSIONES GENERALES

La producción de gas permitió visualizar cambios en fermentadores *in vitro* en condiciones de simulación de acidosis ruminal y cambios provocados por los aditivos: MDS, SCI e INU; pero esta variable sola no permitió establecer si dichos cambios se debieron a un efecto de moderación de la condición simulada.

El pH fue la variable que reflejó más fielmente la evolución de la acidosis representada *in vitro* y los efectos moderadores de dicha acidosis del aditivo MDS y en menor medida de SCI.

Resultó necesario cambiar las condiciones de experimentales realizando un menor tamponamiento para visualizar en mejores condiciones los efectos moduladores de los aditivos utilizados, a través del uso de salivas artificiales como la SA01e y la SA03.

En un futuro se podría requerir mayor experimentación con estos sistemas en diferentes condiciones, por ejemplo testando diferentes sustratos potencialmente acidógenos y diferentes aditivos variando su dosis para validar esta variación del método *gas-in vitro*, para poder posteriormente realizar ensayos *in vitro* en sistemas de fermentación continuo y eventualmente, si se obtuvieran resultados promisorios, realizar ensayos *in vivo* con aquellos productos más prometedores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Akinfemi, A.; Adesanya, A.O.; Aya, V.E. (2009) Use of an *in vitro* gas production technique to evaluate some nigerian feedstuffs. American-Eurasian J. Sci. Res. 4 (4):240-245.
- 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 Uruguayas de Buiatría
- AlZahal, O.; Kebreab, E.; France, J.; McBride, B.W. (2007) A mathematical approach to predicting biological values from ruminal pH measurements. J. Dairy Sci. 90:3777–3785.
- Amer, S.; Hassanat, F.; Berthiaume, R.; Seguin, P.; Mustafa, A.F. (2012) Effects of water soluble carbohydrate content on ensiling characteristics, chemical composition and *in vitro* gas production of forage millet and forage sorghum silages. Anim. Feed Sci. Technol. 177:23– 29.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol., 56: 1919-1925
- Amann, R. I., Krumholz, L., Stahl, D. A. (1990) Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol., 172:762-770.
- Amman, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microb. Rev., 59: 143-169.
- Antolín Domínguez, M.; González Ronquillo, M.; Goñi Cedeño, S.; Domínguez Vara, I.A.; Ariciaga González, C. (2009) Rendimiento y producción de gas *in vitro* de maíces híbridos conservados por ensilaje o henificado. Téc Pecu Méx;47(4):413-423.
- A.O.A.C. (2000) Official Methods of Analysis. 17th ed. Gaithersburg, Maryland, USA, AOAC International.

B

- Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M.D. (2005) Nitrogen metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 88: E9-E21.
- Bannink, A.; Gerrits, W.J.J.; France, J.; Dijkstra, J. (2012) Variation in rumen fermentation and the rumen wall during the transition period in dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol., 172:80-94.
- Beauchemin, K.A.; Yang, W.Z.; Morgavi, D.P.; Ghorbani, G.R.; Kautz, W.; Leedle, J.A.Z.(2003) Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. J. Anim. Sci., 81.:1628-1640.
- Beauchemin, K.A.; Yang, W.Z. (2005) Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. J. Dairy Sci., 88:2117-2129.

- Beuvink, J.M.W.; Spoelstra, S.F. (1992) Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37:505-509.
- 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.
- Brashears, M.M.; Jaroni, D.; Trimble, J. (2003) Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Food Prot.*, 66(3):355-363.
- Britos A., Cajarville C., Aguerre M., Repetto J.L., Garcarena D. (2005) Producción de gas *in vitro* de ensilajes de pasturas con suero de queso como aditivo. *Actas de Fisiología.*, 10: 215
- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C. (2006) Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 89:761–771.

C

- Cajarville, C.; Aguerre, M.; Repetto, J.L. (2006) Rumen pH, NH₃-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim. Res.* 55:511-520.
- 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.
- Callaway, T.R.; Martin, S.A.; Wampler, J.L.; Hill, N.S.; Hill, G.M. (1997) Malate content of forage varieties commonly fed to cattle. *J. Dairy Sci.* 80:1651–1655.
- Callaway, T.R.; Edrington, T.R.; Poole, T.L.; Nisbet, D.J. (2012) Chapter 8. Current Status of Practical Applications: Probiotics in Dairy Cattle. EN: *Direct-Fed Microbials and Prebiotics for Animals: Science and Mechanisms of Action*. Callaway, T.R.; Ricke, S.C. (eds.). New York; Springer-Verlag.
- Calsamiglia, S.; Ferret, A. (2002) Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: Acidosis y Meteorismo. EN: XVIII Curso de Especialización FEDNA, 4 y 5 de noviembre de 2002, Barcelona, España.
- Calsamiglia, S.; Busquet, M.; Cardozo, P.W.; Castillejos, L.; Ferret, A. (2007) Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580–2595.
- Carro, M.D.; López, S.; Valdés, C.; Ovejero, F.J. (1999) Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.* 79:279–288.
- Carro M.D. & Ranilla M.J. (2003) Effect of the addition of malate on *in vitro* rumen fermentation of cereal grains. *Br J Nutr* 89:181–188

- Carro, M.D.; Ranilla, M.J. (2003) Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen micro-organisms *in vitro*. Br. J. Nutr. 90: 617–623.
- 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.
- Carro, M.D.; Ranilla, M.J.; Giráldez, F.J.; Mantecón, A.R. (2006) Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet. J. Anim. Sci. 84:405–410.
- Cepero Briz, (2005) Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: causas y consecuencias. Disponible en: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1142587453a.pdf; consultada: 18/07/2015.
- Chesson A.; Forsberg, C.W. (1997) Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. En: The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson, P.N.; Stewart, C.S. Editors. London, Blackie Academic & Professional.
- Cobos-Peralta, M.A.; Guerra-Medina, E.; López-Garrido, S.J.; Báez-Pérez, J.L.; González-Muñoz, S.S.; Mendoza-Martínez, G.D. (2005) Evaluación *in vitro* de dos amortiguadores y un ionóforo sobre variables fermentativas y microbiológicas. Agrociencia 39:1-9.
- Cogliani, C.; Goossens, H.; Greko, C. (2011) Restricting Antimicrobial Use in Food Animals: Lessons from Europe. Microbe 6(6):274-279.
- 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–1057S.
- 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.

D

- Del Valle, J.I. (1986) La ecuación de crecimiento de von Bertalanffy en la determinación de la edad y el crecimiento de arboles tropicales. Rev. Fac. Nac. Agron., Medellín 39(1):61-74.
- De Nardi, R.; Marchesini, G.; Plaizier, J.C.; Li, S.; Khafipour, E.; Ricci, R.; Andrighetto, I.; Segato, S. (2014) Use of dicarboxylic acids and polyphenols to attenuate reticular pH drop and acute phase response in dairy heifers fed a high grain diet. BMC Veterinary Research 10:277. DOI: 10.1186/s12917-014-0277-5. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/s12917-014-0277-5.pdf>. Consultado: 15/06/2015.
- de Vaux, A.; Morrison, M. Hutkins, R.W. (2002) Displacement of *Escherichia coli* O157:H7 from rumen containing prebiotic sugars. App. Environ. Microbiol., 68:519-524.

- Dijkstra, J.; Ellis, J.L.; Kebreab, E.; Strathe, A.B.; López, S.; France, J.; Bannink, A. (2011) Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Anim. Feed Sci. Technol.* 172, 22–33.
- dos Santos Monnerat, J.P.I.; Veiga Rodrigues Paulino, P.; Edenio Detmann, D.; Campos Valadares Filho, S.; Ferreira Valadares, R.D.; Souza Duarte, M (2013) Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and monensin on digestion, ruminal parameters, and balance of nitrogenous compounds of beef cattle fed diets with different starch concentrations. *Trop. Anim. Health Prod.*, 45:1251–1257.
- Duncan, S.H.; Scott, K.P.; Ramsay, A.G.; Harmsen, H.J.M.; Welling, G.W.; Stewart, C.S. & Flint, H.J. (2003) Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentor system. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1136–1142.
- Durmic, Z.; Hutton, P.G.; Murray, K.; Verco, P.E. (2012) Inclusion of selected levels of Australian native plant *Eremophila glabra* in fermentation substrate can influence events leading to rumen lactic acidosis in *in vitro* and *in vivo* carbohydrate-challenged systems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 178:57– 66.

E

- Elghandour, M.M.Y.; Salem, A.Z.M.; Gonzalez-Ronquillo, M.; Bórquez, J.L.; Gado, H.M.; Odongo, N.E.; Peñuelas, C.G. (2013) Effects of exogenous enzymes on *in vitro* gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 179:46–53.
- Enemark, J.M.D.; Jørgensen, R.J. (2001) Subclinical rumen acidosis as a cause of reduced appetite in newly calved dairy cows in Denmark: results of a poll among Danish dairy practitioners. *Vet. Q.*, 23:206-210.
- Enemark, J.M.D.; Jørgensen, R.J.; Kristensen, N.B. (2004) An evaluation of parameters for the detection of Subclinical Rumen Acidosis in dairy herds. *Veterinary Research Communications*, 28:687-709.
- Enemark, J.M.D. (2009) The monitoring, prevention and treatment of subacute ruminal acidosis (SARA): A review. *The Veterinary Journal*, 176:32–43.
- Evans, J.D.; Martin, S.A. (1997) Factors Affecting Lactate and Malate Utilization by *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4853–4858.
- Ewaschuk, J.B.; Naylor, J.M.; Zello G.A. (2005) D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism. *J. Nutr.*, 135:1619–1625.

F

- FAO/WHO (2006) Probiotics in Food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and nutrition paper N° 85. Roma, FAO.
- Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M. H., Liévin-Le Moal, V., Servin, L. (2005) pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-

dependent activities of probiotic lactobacilli against Serovar *Typhimurium*. Appl. Environ. Microbiol., 71: 6008–6013.

- Figueroa Velasco, J.L.; Chi Moreno, E.E.; Cervantes Ramírez, M.; Domínguez Vara, I.A. (2006) Alimentos funcionales para cerdos al destete. Vet. Méx. 37(1):117-136.
- Firkins, J. L.; Hristov, A. N.; Hall, M. B.; Varga, G. A.; St-Pierre, N. R. (2006) Integration of Ruminant Metabolism in Dairy Cattle. J. Dairy Sci., 89(E. Suppl.):E31–E51.
- Fondevila, M.; Perez-Espés, 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.
- Fontenot, J.P.; Huchette, H.M. (1993) Feeding sorbitol alone or in combination with monensin to finishing cattle. J. Anim. Sci., 71:545-551.
- Fraga, M.; Perelmuter, K.; Valencia, M.J.; Martínez, M.; Abin-Carrquiry, A.; Cajarville, C.; Zunino, P. (2013) Evaluation of native potential probiotic bacteria using an *in vitro* ruminal fermentation system. Ann. Microbiol. 64:1149-1156.

G

- Garner, M.R.; Gronquist, M.R.; Russel, J.B. (2004) Nutritional requirements of *Allisonella histaminiformans*, a ruminal bacterium that decarboxylates histidine and produces histamine. Curr. Microbiol., 49(4):295-299.
- Getachew, G.; Blümmel, M.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. (1998) *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Anim. Feed Sci. Technol. 72:261-281.
- Ghorbani, G.R.; Morgavi, D.P.; Beauchemin, K.A.; Leedle, J.A.Z. (2002) Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. J. Anim. Sci., 80:1977-1986.
- 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. Colomb. Cienc. Pecuaria. 20:269-279.
- Gómez, J.A.; Tejido, M.L.; Carro, M.D. (2005) Influence of disodium malate on microbial growth and fermentation in rumen-simulation technique fermenters receiving medium- and high-concentrate diets. Br. J. Nutr. 93:479–484.
- González Rodríguez, M.; Resillez Pujal, A.A.; Pedraza Olivera, R.M.; Martínez Sáez S.J. (2013) Validación de heces ovinas con la técnica de gas *in vitro* para valorar alimentos destinados a rumiantes. Rev. prod. Anim., 25 (1): 2013; disponible en: <http://www.reduc.edu.cu/147/13/1/147130102.pdf> (consultado: 24/01/2014).
- Gozho, G.N.; Plaizier, J.C.; Krause, D.O.; Kennedy, A.D.; Wittenberg, K.M. (2005) Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory

response. J. Dairy Sci., 88:1399-1403.

H

- Hungate R.E. (1966) The rumen and its microbes. New York: Academic Press, 533 p.

J

- Jouany, J.P., Mathieu, F., Senaud, J., Bohatier, J., Bertin, G., Mercier, M. 1998. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of the cell wall fraction of a mixed diet in defaunated and refaunated sheep rumen. Reprod. Nutr. Dev., 38(4):401-416.

K

- Kaufmann, W.; Hagemeister, W.; Dirksen, G. (1980) Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. IN: Digestive physiology and metabolism in ruminants. Eds. Ruckebusch, Y; Thivend, P. AVI Publishing Co., Westport, CT. 587
- Keunen, J. E.; Plaizier, J. C.; Kyriazakis, L.; Duffield, T. F.; Widowski, T. M.; Lindinger, M. I.; McBride, B. W. (2002) Effects of a Subacute Ruminal Acidosis Model on the Diet Selection of Dairy Cows. J. Dairy Sci. 85:3304-3313.
- Keunen, J. E.; Plaizier, J. C.; Kyriazakis, I.; Duffield, T. F.; Widowski, T. M.; Lindinger, M. I.; McBride, B. W. (2003) Short Communication: Effects of Subacute Ruminal Acidosis on Free-Choice Intake of Sodium Bicarbonate in Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci., 86:954-957.
- Kingsley, V.V.; Hoeniger, J.F.M. (1973) Growth, Structure, and Classification of *Selenomonas*. Bacteriological Reviews, 37:479-521
- Klaenhammer, T.R.; Kullen, M.J. (1999) Selection and design of probiotics. Int J Food Microbiol. 50:45-57.
- Kleen, J.L.; Hooijer, G.A.; Rehage, J.; Noordhuizen, J.P.T.M. (2003) Subacute Ruminal Acidosis (SARA): a Review. J. Vet. Medicine Series A. 50:406-414.
- Kleen, J.L.; Cannizzo, C. (2012) Incidence, prevalence and impact of SARA in dairy herds. Anim. Feed Sci. Technol. 172:4-8.
- Kollár, R.; Reinhold, B.B.; Petráková, E.; Yeh, H.J.C.; Ashwell, G.; Drgonová, J.; Kapteyn, J.C.; Klis, F.M.; Cabib, E. (1997) Architecture of the Yeast Cell Wall. $\beta(1\rightarrow6)$ -Glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucan, and chitin. J.Biol.Chem., 272:17762-17775.
- Kozloski, G.V.; Lima, L.D.; Cadorin Jr., R.L.; Bonnacarrère Sanchez, L.M.; Senger, C.C.D.; Fiorentini, G.; Härter, C.J. (2008) Microbial colonization and degradation of forage samples incubated *in vitro* at different initial pH. Anim. Feed Sci. Technol., 141:356-367.
- Krause, K.M.; Combs, D.K. (2003) Effects of particle size, forage, and grain fermentability on performance and ruminal pH in mid lactation cows. J. Dairy Sci. 86:1382-1397.
- Krause, K. M.; Oetzel, G. R. (2005) Inducing Subacute Ruminal Acidosis in Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci., 88:3633-3639.

- Krause, K., & Oetzel, G. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 126(3/4), 215-236.
- Krause, K., Dhuyvetter, D., & Oetzel, G. (2009). Effect of a low-moisture buffer block on ruminal pH in lactating dairy cattle induced with subacute ruminal acidosis. *J. Dairy Science*, 92(1), 352-364.
- Krishnamoorthy, U.; Solled, H.; Steingass, H.; Menke, K.H. (1995) Energy and protein evaluation of tropical feedstuffs for whole tract and ruminal digestion by chemical analyses and rumen inoculum studies *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 52:177-188.
- Kung, L.; Huber, J.T.; Krummrey, J.D.; Allison, L.; Cook, R.M. (1982) Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids, digestibility, and nitrogen utilization. *J Dairy Sci.* 65:1170-1174.

L

- Lema, M.; Williams, L.; Rao, D.R. (2001) Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Ruminant Res.*, 39:31–39.
- Lettat, A.; Nozière, P.; Silberberg, M.; Morgavi, D. P.; Berger, C.; Martin, C. (2010) Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. *J. Anim. Sci.*, 88:3041–3046.
- Lettat, A.; Nozière, P.; Silberberg, M.; Morgavi, D. P.; Berger, C.; Martin, C. (2012) Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *BMC Microbiology*, 12:142; disponible en <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/142.pdf>; consultado:14/03/2015
- 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
- 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.
- López, S.; Dhanoa, M.S.; Dijkstra J.; Bannink, A.; Kebreab, E.; France, J. (2007) Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135:139–156.
- Lund, A. (1974) Yeasts and moulds in the bovine rumen. *J Gen Microbiol.* 81:453-62.

M

- Marounek, M.; Fliegrova, K.; Bartos, S. (1989) Metabolism and some

characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. Appl. Environ. Microbiol. 55:1570-1573

- Martin, S.A.; Nisbet, D.J. (1992) Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. J Dairy Sci. 75:1736-1744.
- Martin, S.A.; Streeter, M.N. (1995) Effect of malate on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. J. Anim. Sci. 73:2141-2145.
- Martin, S.A. (1998) Manipulation of Ruminal Fermentation with Organic Acids: A Review. J. Anim. Sci., 76:3123–3132.
- 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.
- Martin, S.A. (2004) Effects of DL-Malate on *in vitro* forage fiber digestion by mixed ruminal microorganisms. Curr. Microbiol. 48:27–31.
- Martin, C.; Brossard, L.; Doreau, M. (2006) Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. INRA Prod. Anim., 19(2):93-108.
- Mauricio, R.; 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.
- Meissner, H.H.; Henning, P.H.; Leeuw, K.J.; Hagg, F.M.; Horn, C.H.; Kettunen, A.; Apajalahti, J.H.A. (2014) Efficacy and mode of action of selected non-ionophore antibiotics and direct-fed microbials in relation to *Megasphaera elsdenii* NCIMB41125 during *in vitro* fermentation of an acidosis-causing substrate. Livestock Science 162:115–125.
- 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*. The Journal of Agricultural Science, 93:217-222.
- Meschy, F.; Bravo, D.; Sauvart, D. (2004) Analyse quantitative des réponses des vaches laitières à l'aport de substances tampon. INRA Prod. Anim., 17:11-18.
- Murray, J.M.D.; McMullin, P.; Handel, I.; Hastie, P.M. (2014) Comparison of intestinal contents from different regions of the equine gastrointestinal tract as inocula for use in an *in vitro* gas production technique. Anim. Feed Sci. Technol. 187:98– 103
- Mwenya, B.; Santoso, B.; Sar, C.; Pen, B.; Morikawa, R.; Takaura, K. (2005) Effects of yeast culture and galacto-oligosaccharides on ruminal fermentation in Holstein cows. J. Dairy Sci., 88:1404 1412

N

- Nayak, S.K.; Swain, P.; Mukherjee, S.C. (2007) Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish & Shellfish Immunol. 23:892–896.
- Newbold, C. J.; Wallace, R. J.; Watt, N. D.; Richardson, A. J. (1988). Effect of the novel ionophore tetronasin (ICI 139603) on ruminal

microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 54:544–547.

- Newbold, C.J.; Wallace R.J. (1988) Effects of the ionophores Monensin and Tetronasin on simulated development of ruminal lactic acidosis *in vitro* Appl. Environ. Microbiol. 54:2981-2985.
- Nisbet, D.J.; Martin, S.A. (1990) Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. Appl. Environ. Microbiol. 56:3515-3518.
- 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.
- 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*. Curr. Microbiol. 26:133-136.
- Nisbet, D.J.; Martin, S.A. (1994) Factors affecting L-lactate utilization by *Selenomonas ruminantium*. J. Anim. Sci. 72:1355-1361
- Nocek, J. (1997) Bovine acidosis: Implications on laminitis. J. Dairy Sci., 80:1005–1028
- 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

O

- Oeztuerk, H.; Schroeder, B.; Beyerbach, M.; Breves, G. (2005) Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* ruminal microbial metabolism J. Dairy Sci. 88:2594-2600.
- Osborne, J.M.; Dehority, B. A. (1989) Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose, and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2247-2250.
- Öztürk, H. (2008) Effects of inulin on rumen metabolism *in vitro*. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 55:79-82.
- Öztürk, H. (2009) Effects of chicory inulin on ruminal fermentation *in vitro*. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 56:171-175.

P

- Parés-Casanova, P.M.; Kucherova, I. (2014) Comparación de modelos no lineales para describir curvas de crecimiento en la cabra catalana. Rev Inv Vet Perú 25(3):390-398.
- Píknova, M., Filová, M., Javorský, P., Pristas, P. (2004) Different restriction and modification phenotypes in ruminal lactate-utilizing bacteria. FEMS Microbiol Lett. 236:91-95.
- Posadas, S.J.; Caz, V.; Caballero, I.; Cendejas, E.; Quilez, I.; Largo, C.; Elvira, M.; De Miguel, E. (2010) Effects of mannoprotein E1 in liquid diet on inflammatory response and TLR5 expression in the gut of rats infected by *Salmonella typhimurium*. BMC Gastroenterology 10:58. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471->

R

- Rearte, D.H. (1992) Alimentación y composición de la leche en los sistemas pastoriles. Ed. CERBAS-INTA. Argentina.
- Reid, G. (1999) The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *App. Environ. Microbiol.*, 65:3763-3766.
- Rémond, B., Brugère, H., Poncet, C., Baumont, R., (1995) Le contenu du réticulo-rumen. En: *Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion*. Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.H., Journet, M. (Eds.), INRA Editions, Paris, pp. 253–298.
- Rossi, F.; Di Luccia, A.; Vincenti, D.; Coconcelli, 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.
- Russell, J.B.; Cotta, M.A.; Dombrowski, D.B. (1981) Rumen bacterial competition in continuous culture: *Streptococcus bovis* versus *Megasphaera elsdenii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:1394-1399.
- Russell, J.B.; Hespell, R.B. (1981) Microbial rumen fermentation. *J. Dairy Sci.* 64: 1153-1169.
- Russell, J.B.; Hino, T. (1985) Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J. Dairy Sci.* 68:1712.
- Russell, J.B. (1987) Effect of extracellular pH on growth and proton motive force of *Bacteroides succinogenes*, a cellulolytic ruminal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2379–2383.
- Russell, J.B., & Strobel, H.J. (1989). Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1–6.
- Russell, J.B., & Wallace, R.J. (1997) Energy-yielding and energy-consuming reactions. En: *The Rumen Microbial System*. Hobson, P.N. & Stewart, C.S. Editors. London, Blackie Academic & Professional.
- Russell, J.B.; Wilson, D.B. (1996) Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79:1503-1509.
- Rymer, C.; Huntington, J.A.; Williams, B.A.; Givens, D.I. (2005) *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124:9–30.

S

- 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.
- Sauvant, D.; Giger-Reverdin, S.; Meschy, F. (2006) Le contrôle de l'acidose ruminale latente. *INRA Prod. Anim.*, 19:69-78.
- Schelling, G.T. (1984) Monensin mode of action in the rumen. *J. Anim. Sci.* 58:1518-1527.
- Schofield, P.; Pell, A.N. (1995) Validity of using accumulated gas

pressure readings to measure forage digestion *in vitro*: A comparison involving three forages. J Dairy Sci 78:2230-2238.

- Senger, C.C.D.; Frenzel Mühlbach, P.R.; Bonnacarrère Sanchez, 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.
- Spears, J.W. (1990) Ionophores and Nutrient Digestion and Absorption in Ruminants. J. Nutr. 120:632-638.
- Spring, P.; Wenk, C.; Dawson, K.A.; Newman, K.E. (2000) The Effects of Dietary Mannanooligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric Bacteria in the Ceca of *Salmonella*-Challenged Broiler Chicks. Poultry Science 79:205–211.
- Strobel, H.J. y Russell, J.B. 1986. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. J. Dairy Sci. 69:2941-2947.
- Sullivan, H.M.; Martin, S.A. (1999) Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. J. Dairy Sci., 82:2011-2016.

T

- Tscherning, K.; Barrios, E.; Lascano, C.; Peters, M.;Schultze-Kraft, R. (2005) Effects of sample post harvest treatment on aerobic decomposition and anaerobic in-vitro digestion of tropical legumes with contrasting quality. Plant and Soil, 269:159–170.
- Theodorou, M.K.; Williams, B.A.; Dhanoa, M.S.; McAllan, France, A.B.; J. (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Technol. 48:185-197
- Tung, R.S. & Kung, L. (1993) *In vitro* effects of a thiopeptide and monensin on ruminal fermentation of soluble carbohydrates. J Dairy Sci 76:1083-1090
- 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

V

- Van Loo, J. (2007) How chicory fructans contribute to zootechnical performance and well-being in livestock and companion animals. J. Nutr. 137: 2594S–2597S.
- Van Soest, P. J. (1994) Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca, N.Y. Cornell University Press.
- Vázquez-Armijo, J.F.; Martínez-Tinajero, J.J.; López, D.; Abdel-Fattah Zeidan Mohamed Salem; Rojo, R. (2011) *In vitro* gas production and dry matter degradability of diets consumed by goats with or without

- copper and zinc supplementation. *Biol Trace Elem Res*, 144:580–587
- Vyas, D.; Uwizeye, A.; Mohammed, R.; Yang, W.Z.; Walker, N.D.; Beauchemin, K.A. (2014) The effects of active dried and killed dried yeast on subacute ruminal acidosis, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in beef heifers. *J. Anim. Sci.*, 92:724–732.

W

- Weimer, P.J. (1998) Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.*, 76:3114-3122.
- Weimer, P.J.; Dien, B.S.; Springer, T.L.; Vogel, K.P. (2005) *In vitro* gas production as a surrogate measure of the fermentability of cellulosic biomass to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67:52–58.
- Willis, W.L.; Reid, L. (2008). Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poultry Sci.*, 87:606-611.
- Wilson, B.K.; Krehbiel, C.R. (2012) Chapter 9. Current and Future Status of Practical Applications: Beef Cattle. EN: *Direct-Fed Microbials and Prebiotics for Animals: Science and Mechanisms of Action*. Callaway, T.R.; Ricke, S.C. (eds.). New York ; Springer-Verlag.

Y

- 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.

Z

- Zani, J.K; Weykamp da Cruz, F.; Freitas dos Santos, A.; Gil-Turnes, C. (1998) Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. *J. Appl. Microbiol.*, 84:68-71.
- Zhao, X.H.; Gong, J.M.; Zhou, S.; Liu, C.J.; Qu, M.R. (2014) The effect of starch, inulin, and degradable protein on ruminal fermentation and microbial growth in rumen simulation technique. *Ital.J.Anim.Sci.* 13:189-195.