



EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS NATIVAS DE RUMEN EN UN MODELO DE ACIDOSIS IN VITRO

Perelmuter K¹, Fraga M¹, Valencia M¹, Cajarville C², Zunino P¹

¹Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Av Italia 3318, CP 11600.

²Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria. Lasplaces 1550, CP 11600. Montevideo.

Resumen

La biota ruminal puede ser alterada por diversos factores entre los que se encuentran los dietarios. Cepas probióticas aisladas y seleccionadas a partir de esta comunidad podrían influir en su composición evitando estas alteraciones o restituyendo las condiciones normales, de modo de brindar un efecto beneficioso para el animal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad moduladora de la fermentación ruminal in vitro mediante el empleo de cepas potencialmente probióticas. Se analizaron cuatro cepas nativas de rumen con potenciales propiedades probióticas en un modelo de acidosis bovina en fermentadores in vitro. Se registraron pH y volumen del gas producido en los fermentadores inoculados con las cepas analizadas. La producción de gas se ajustó a un modelo bicompartimentalizado. En todos los casos se observó una disminución del pH en función del tiempo y no se registró un efecto significativo de la atenuación del mismo por el agregado de las cepas probióticas. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros del modelo utilizado ni entre el volumen de gas producido para cada tiempo.

Introducción y Objetivo

La biota ruminal es una compleja comunidad simbiótica compuesta de microorganismos eucariotas y procariotas entre los que se encuentran bacterias, arqueas, hongos y protozoarios. El rumiante provee a los microorganismos de un ambiente estable y propicio para realizar la fermentación de fibras y los microorganismos proveen al animal de proteína microbiana y energía en forma de ácidos grasos volátiles (Mackie et al., 1990). Este complejo equilibrio puede ser alterado por factores dietarios como la ingesta de carbohidratos fácilmente fermentables que conllevan a un aumento de ácidos grasos ruminales y una disminución del pH ruminal junto con un desbalance en la intrínca-da trama trófica microbiana que termina impidiendo el proceso de celulolisis y constituye una patología conocida como acidosis (Owens et al., 1998).

Una posible estrategia para prevenir y tratar este tipo de patologías asociadas a desbalances en la composición de la microbiota es la modulación de la misma mediante el empleo de probióticos, microorganismos nativos que al ser administrados al huésped le confieren algún beneficio. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad moduladora de la fermentación ruminal mediante el empleo de cepas potencialmente probióticas utilizando la técnica de producción de gas in vitro.

Materiales y Métodos

Cepas y condiciones de cultivo. Las cepas nativas utilizadas en el ensayo, 3F11L, 2C1, CA, 2C4, aisladas de contenido y fluido ruminal bovino fueron seleccionadas por poseer actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Streptococcus spp.* y capacidad de crecer en medio selectivo con lactato como única fuente de carbono y energía (Perelmuter et al 2008).

Ensayo de producción de gas in vitro. Se utilizó como sustrato una mezcla molida de forraje avena y grano de cebada en relación 1:1 (m/m). Se colocaron 500 mg de sustrato en frascos de vidrio de 125 ml al cual se le adicionaron 40 ml de la solución buffer descrita por Williams et al. (2005) sin el agregado de la solución de bicarbonato de sodio y con la mitad de fosfato de sodio y de potasio, con la finalidad de disminuir el efecto tampón. Los frascos fueron gaseados con CO₂ y se mantuvieron refrigerados a 4°C durante 12 horas. Luego los frascos se precalentaron a 39.5 y cada frasco se inoculó con 10 ml de líquido ruminal extraído de una vaca Holstein canulada en rumen. Un grupo de frascos sin sustrato se utilizó como blanco mientras que un grupo de frascos a los que no se le agregó ningún probiótico se utilizó como control.

Durante el ensayo los frascos se incubaron a 39,5 °C en baño de agua. Se midió la presión del interior por triplicado utilizando un manómetro digital a los tiempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h. El pH se midió por triplicado a las 0, 4, 12, 24 y 96 h.

Procesamiento y análisis de datos. La presión registrada fue convertida a volumen de gas producido según Britos et al., 2008.

Se comparó el volumen de gas producido para cada tiempo entre las diferentes cepas y el control utilizando el test ANOVA y Tuckey y Dunnett como test a posteriori, las diferencias se consideraron significativas cuando P ≥ 0.05. Los datos se ajustaron al siguiente modelo

bicompartimental:

$$Vol = \frac{V_r}{1 + e^{2+4k_{dr}(L-T)}} + \frac{V_{fl}}{1 + e^{2+4k_{dl}(L-T)}}$$

donde Vr es Volumen de gas producido por la degradación de la fracción soluble, Kdr es la tasa de degradación de la fracción soluble, Vl: Volumen de gas producido durante la degradación de la fracción no soluble, Kdl es la tasa de degradación de la fracción no soluble y L la fase Lag.

Resultados

No se encontraron diferencias significativas en la producción de gas en los sistemas en los cuales se evaluaron las distintas cepas.

Tabla 1. Parámetros de la cinética de producción de gas.

	Vr (ml/g de MS de sustrato)	(Kdr)(h ⁻¹)	VI (ml/g de MS de sustrato)	(Kdl)(h ⁻¹)	L (h)
control	39,8±16,0	0,109±0,0462	60,3±19,4	0,0286±0,0110	0,622±0,645
3F11L	37,9±10,3	0,116±0,0219	62,2±4,64	0,0311±0,0032	0,220±0,228*
2C1	37,8±7,90	0,116±0,018	62,2±2,56	0,0305±0,0023	0,181±0,186*
CA	41,7±14,3	0,103±0,0386	47,9±18,1	0,0262±0,0934	0,184±0,239*
2C4	25,0±4,80	0,175±0,020	66,8±6,8	0,0359±0,0010	1,49±0,145*

* tuckey p<0.05

Los parámetros obtenidos del modelo utilizado para describir la cinética de producción de gas en los fermentadores se muestran en la tabla 1. No se encontraron diferencias significativas en los diferentes parámetros entre las diferentes cepas salvo en el tiempo de la fase lag (L) que fue mayor para 2C4 si se comparan con las otras tres cepas. Se observó una disminución del pH en función del tiempo de incubación similar para todas las cepas (Fig 1) no encontrándose diferencias significativas entre ellas.

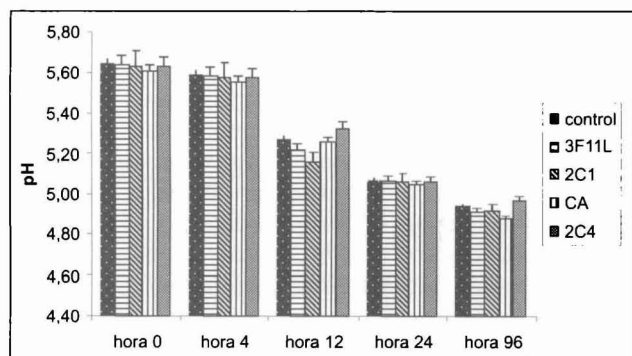


Figura 1. Medidas de pH en función del tiempo para las diferentes cepas analizadas. Se grafica el promedio de 3 medidas SD

Discusión y Conclusiones

Las condiciones utilizadas en el presente ensayo (modificadas a partir de Williams et al, 2005) permitieron registrar la disminución del pH debido a la actividad metabólica del fluido ruminal in vitro. Este comportamiento observado es similar al registrado en ensayos in vivo en animales sufriendo acidosis por lo cual podría usarse como un modelo in vitro de acidosis bovina.

En cuanto a las cepas utilizadas en el presente trabajo,

ninguna tendría un efecto en la atenuación de la disminución del pH en el sistema in vitro empleado. En próximos ensayos se evaluarán estas y otras cepas en diferentes condiciones de incubación también se tendrán en cuenta otros parámetros.

Summary

Ruminal microbiota can be altered by several factors including diet. Probiotics isolated from this community would influence in biota composition preventing disorders and could confer a health benefit to the animal host. The objective of this work was to evaluate the in vitro ability of ruminal isolates in modulating the ruminal fermentation. Four potentially probiotic native isolates were assayed in an acidosis in vitro model performed in batch culture. Gas produced and pH were registered in cultures inoculated with the analyzed strains. The gas data were adjusted to a mathematical model. For every strain culture a time dependant pH decrease was observed but no significant attenuation in this decrease was recorded. No differences were observed when comparing neither the model parameters nor the gas volume produced.

Bibliografía

- Britos A., et al., 2008. Libro de Resúmenes XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría pág: 273-275.
 Mackie R., et al., 1990. J. Dairy Sci. 73:2971-2995.
 Owens F., et al., 1998. J. Anim. Sci. 76:275-286.
 Perelmuter K., et al., 2008. Libro de Resúmenes XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría pág: 208-209.
 Williams B., et al., 2005. Anim. Feed Sci. Technol. 123-125:445-462.