



APROXIMACION A UN MODELO EXPERIMENTAL IN VITRO PARA ESTUDIAR LA ACIDOSIS RUMINAL SUBAGUDA.

Aldrovandi, A.¹; Molina, A.¹; Paz, S.¹; Cajarville, C.¹; Zunino, P.².

¹Facultad de Veterinaria, UdelaR. Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay. aralvet@gmail.com

Financiado por PDT-DICyT y CIDEC

²Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Resumen

En la actualidad no se dispone de modelos *in vitro* sencillos de reproducción de la acidosis ruminal subaguda, que eviten trabajar sobre los animales, con resultados rápidos y poco costosos. El objetivo de este trabajo fue comparar la dinámica de descenso del pH en fermentadores *in vitro* utilizando diferentes condiciones. Se utilizaron 3 salivas artificiales, en pares con y sin sustrato (grupo control). Se trabajó por triplicado y con un set para cada tiempo de medida, totalizando 72 unidades experimentales. Las mismas fueron incubadas a 39 °C durante 24 hs, obteniéndose medidas de pH a los tiempos: 0, 4, 12 y 24 hs. Los datos se analizaron por Análisis de Varianza y se graficaron para determinar la evolución del pH. La saliva de Duncan modificada mostró el mejor efecto tampón a lo largo del tiempo en las muestras sin sustrato, exhibiendo una diferencia de pH en las muestras con sustrato. Se ubicó en segundo lugar la saliva de Tung & Kung. La saliva de Williams modificada también mostró el efecto sustrato, pero el valor de pH inicial fue muy bajo incluso sin sustrato.

Introducción

La acidosis ruminal subaguda (SARA por su sigla en inglés), es una enfermedad de la producción (O'Grady et al, 2008) con mayor importancia, a medida que se intensifican los sistemas de producción de ganado de carne y leche. Por tal motivo es interesante disponer de modelos *in vitro* sencillos que reproduzcan experimentalmente este padecimiento y que permitan sentar las bases para una toma de acciones racional dirigida a su control. De esta manera se evitaría la necesidad de trabajar directamente sobre los animales, acelerando la obtención de resultados y reduciendo los costos de los ensayos.

Aún no se dispone de este tipo de sistemas, habiendo en cambio, simulaciones experimentales realizadas con animales y aproximaciones matemáticas del tipo de modelos polinómicos (Kleen et al, 2003; Krause & Oetzel, 2005 y 2006; Krause et al, 2009), con factores de diferente comportamiento, algunos incluso de tipo estocástico.

El método de medición de la producción de gas *in vitro* fue desarrollado por Menke y modificado por Theodorou y se utiliza para predecir la digestibilidad y degradabilidad de alimentos, en su versión más sencilla (midiendo el volumen de gas producido acumulado), de manera similar a la usada en este trabajo (Rymer et al, 2005).

El objetivo de este trabajo fue comparar la dinámica de descenso del pH en fermentadores *in vitro* utilizando diferentes salivas artificiales a fin de iniciar una puesta a punto de su uso como modelo de reproducción de acidosis ruminal.

Materiales y Métodos

Diseño del sistema: Para el estudio se emplearon 72 sistemas de fermentación (ver Cuadro 1), arreglados según el siguiente diseño: **4 tiempos** de fermentación, en cada tiempo simultáneamente se compararon **3 soluciones** que denominaremos "salivas artificiales", para **cada una** de las salivas artificiales se trabajó con **parejas** con sustrato "proacidótico" y sin sustrato (control). Cada tratamiento se realizó por **triplicado**.

Cuadro 1. Sistemas de fermentación.

Continente	Contenido
Frasco de 125 mL de color caramelo	Líquido ruminal fresco ¹ - 10 mL
Tapón de goma (facilita un cierre hermético)	Sustrato ² - 500 mg
Precinto de aluminio	Saliva artificial ³ - 40 mL
	Agente reductor (Na ₂ S al 6 %) 0,5 mL

1. Obtenido de una vaca normal con una alimentación con pasturas y suplemento; la vaca estaba bien alimentada con un rumen con abundante contenido en el momento de la extracción. Componente constante.

2. Mezcla de gramíneas y leguminosas en estado vegetativo y granos de cebada molida con la siguiente proporción: 50% de forraje y 50% de cebada (m/m como materia seca). Componente constante (ausente en los frascos control, denominados "Sin Sustrato").

3. Se incluyeron tres formulaciones diferentes seleccionadas a partir de trabajos de otros autores y a partir de resultados de experimentos previos. Componente variable cuyos efectos se comparan.

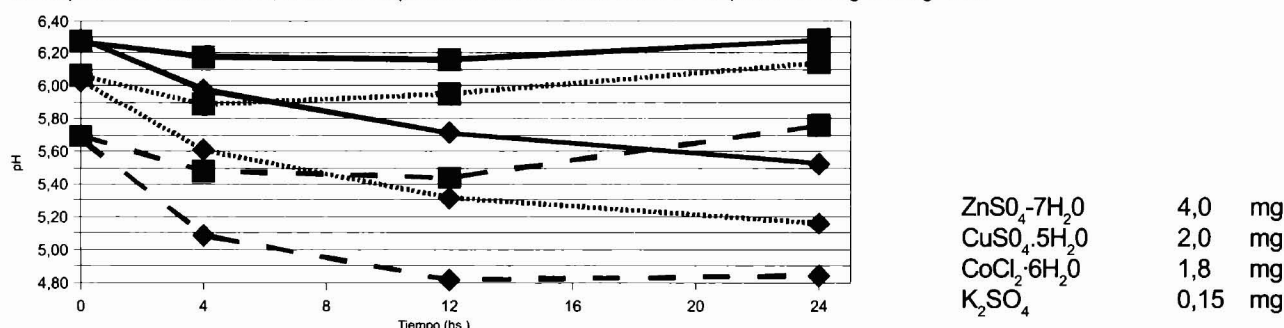
Las salivas artificiales empleadas constituyeron la principal variable experimental, ya que se evaluó su efecto sobre la respuesta de pH del sistema.

Los frascos se taparon y precintaron y se dejaron incubando a 39 °C. Se realizó la medición de pH a las 0, 4, 12 y 24 hs a partir del comienzo de la incubación. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza considerando los efectos: tiempo, tratamiento y sustrato (en este caso se usó t de Student).

Cuadro 2. Salivas artificiales utilizadas (formulación para 1 L)

Saliva wm ¹			Saliva dm ²			Saliva tk ³		
Ingrediente	Cantidad	Unidad	Ingrediente	Cantidad	Unidad	Ingrediente	Cantidad	Unidad
KCl	0,6 g		NaHCO ₃	4,0 g		Na ₂ HP0 ₄ ·12H ₂ O	0,76 g	
NaCl	0,6 g		K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,59 g		KH ₂ PO ₄	0,153 g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g		KH ₂ PO ₄	0,45 g		NaHCO ₃	2,625 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g		NaCl	1,0 g		HCl	0,25 g	
KH ₂ PO ₄	0,73 g		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,09 g		NaCl	0,375 g	
Na ₂ HPO ₄	1,775 g		CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,12 g		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,245 g	
Sol. minerales	traza		Hemina	0,01 g		CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05 g	
Sol. Hemina	10 mL					FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,8 mg	
						MnSO ₄ ·H ₂ O	4,5 mg	

1. Adaptada de Williams et al, 2005; 2. Adaptada de Duncan et al., 2003; 3. Adaptada de Tung & Kung, 1993


Cuadro 3. Resultados de los ANOVA realizados*, considerando los principales efectos**

Tratamiento	Efecto tiempo para cada tratamiento + sustrato		Origen de la	Efecto sustrato para cada tratamiento + tiempo		Origen de la	t calculado	Probab.
	F calculado	Probab.		t calculado	Probab.			
wms	30,68	< 0,001	wm - 0 hs.	0,54	n.s.	wm - 12 hs.	6,10	< 0,01
wmc	66,49	< 0,001	dm - 0 hs.	5,00	0,01	dm - 12 hs.	19,76	< 0,001
dms	3,50	n.s.	tk - 0 hs.	1,72	n.s.	tk - 12 hs.	13,51	< 0,001
dmc	115,85	< 0,001	wm - 4 hs.	10,12	< 0,001	wm - 24 hs.	48,41	< 0,001
tkc	19,60	< 0,01	dm - 4 hs.	5,02	< 0,01	dm - 24 hs.	9,31	< 0,001
tkc	646,64	< 0,001	tk - 4 hs.	8,76	< 0,001	tk - 24 hs.	120,03	< 0,001

Claves: wms y wmc significan saliva Williams modificada sin y con sustrato respectivamente; dms y dmc significan saliva Duncan modificada sin y con sustrato respectivamente; tks y tkc significan saliva Tung & Kung modificada sin y con sustrato respectivamente.

* La fuente de variación "triplificados" resultó en todos los casos no significativo (n.s.), es decir con una p > 0.05

** El efecto "tratamiento" en todos los casos resultó altamente significativo (p < 0,001). Todas las salivas tuvieron un patrón de evolución de pH diferente

Resultados y Discusión

Los datos promediados se ilustran en la Figura 1 y los resultados de los análisis de varianza se muestran en el Cuadro 3:

La saliva **dm** no presentó variaciones apreciables en el

tiempo, en los sistemas sin sustrato y en cambio el efecto tiempo resultó muy marcado en los sistemas con sustrato. Esto permitiría evidenciar el efecto de dietas pro-acidóticas. La saliva **tk** se ubicó en segundo lugar respecto a este efecto y por último la **wm**. El análisis del efecto "Saliva", reveló que todas las salivas fueron significativamente dife-



rentes entre sí. Respecto al efecto "Sustrato", se evidenció que todas las salivas hicieron comenzar a los sistemas de fermentación prácticamente en el mismo valor de pH (para cada par de la misma saliva, con y sin sustrato) y que con el paso del tiempo se fueron marcando y acentuando las diferencias entre sí.

El pH no es la única variable a considerar en el fenómeno de la SARA (Beuvink & Spoelstra, 1992; Nagaraja & Titgemeyer, 2006). Por esta razón, en este mismo estudio se extrajeron muestras para estudiar otras variables, que aún se encuentran en proceso de análisis)

Conclusión

En relación a la dinámica del pH, la saliva **dm** parece ser de utilidad en la reproducción de un futuro modelo in vitro para el estudio de SARA, ya que presentó una mejor performance en cuanto a su descenso debido al efecto del sustrato proacidótico a lo largo de tiempo.

Summary

At the moment, there is not any available in vitro model designed to mimic subacute ruminal acidosis. This kind of model could avoid the use of animals and provide a simple and low cost approach to study the disease. The aim of this work was to compare descending pH dynamics by using different artificial salivas in in vitro fermentation devices. They were incubated at 39 °C during 24 h, measuring pH at 0, 4, 12 and 24 h. Data were analyzed by Analysis of Variance and were plotted to determine pH evolution. Duncan modified saliva showed the best buffer performance along the study in samples with no substrate, and they had differences with samples with substrate. The second best performance showed by the Tung & Kung saliva. William modified saliva showed a similar behaviour but pH initial values were very low at the beginning of the assay even with no substrate.

Referencias bibliográficas

Beuvink, J. M. W. & Spoelstra, S. F. (1992) Interactions

between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 505-509

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.

Kleen, J. L.; Hooijer, G. A.; Rehage, J. & Noordhuizen, J. P. T. M. (2003) Subacute Ruminal Acidosis (SARA): a Review. *J. Vet. Med. A* 50, 406-414. ISSN 0931-184X

Krause, K., & Oetzel, G. (2005). Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *J. Dairy Science*, 88(10), 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.

Nagaraja, T. G. & Titgemeyer, E. C. (2006) Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. *J. Dairy Sci.* 90(E. Suppl.):E17-E38

O'Grady, L., Doherty, M., & Mulligan, F. (2008). Subacute ruminal acidosis (SARA) in grazing Irish dairy cows. *Veterinary Journal*, 176(1), 44-49.

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

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

Williams B.A., Bosch M.W., Boer H., Verstegen M.W.A. & Tamminga S. (2005) An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 445-462.