

EFFECTO DE DISTINTAS FRACCIONES DE LA SALIVA DE CABRA SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL

Palma-Hidalgo, J.M., Belanche, A., Martín-García, A.I. y Yáñez-Ruiz, D.R.,
Estación Experimental del Zaidín, CSIC. C/ Profesor Albareda 1, 18008, Granada, España;
juanm.palma@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

La saliva, junto con el agua de bebida, representa el principal aporte de líquido en el rumen, llegando a flujos de entrada de entre 4,22 y 9,05 L/día en ovejas (Duric et al., 1994). La composición y el volumen de saliva que entra en el rumen dependen de muchas variables como la dieta, principalmente, la frecuencia de masticación o la temperatura ambiental. Un componente esencial en la saliva del rumiante son los iones (bicarbonatos, fosfatos, etc.), que ejercen un efecto tampón que previene el descenso del pH ruminal fruto de la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) (Apper-Bossard et al., 2010). Además, una amplia gama de proteínas contribuyen a la regulación del ecosistema ruminal, ya sea mediante la mencionada acción tamponadora (albúmina) o ejerciendo un control sobre la microbiota (lisozima, citoquinas, inmunoglobulinas). Mientras que la lisozima previene la proliferación de bacterias, las inmunoglobulinas, secretadas en la saliva en altas concentraciones (Macpherson et al. 2012), modulan la microbiota favoreciendo el crecimiento de unas especies e inhibiendo el de otras (Donaldson et al. 2018). Concretamente, se ha comprobado que la inmunoglobulina A secretora puede promover cambios en la composición y actividad microbiana del rumen, lo cual también podría explicar las diferencias observadas entre distintos individuos (Fouhse et al., 2017). Pese a ello, se desconoce el mecanismo exacto por el que la saliva, a través de su fracción proteica, ejerce tal control.

El objetivo de este trabajo fue evaluar, mediante incubación *in vitro*, el efecto de las distintas fracciones de la saliva de cabra (iones, microorganismos salivales, proteínas de bajo y alto peso molecular) sobre la fermentación ruminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 4 cabras de raza Murciano-Granadina como donantes de saliva. La saliva fue muestreada en ayunas durante varios días disponiendo esponjas absorbentes en la boca de los animales. Las esponjas se centrifugaron a 190 g durante 10 minutos para recoger la saliva. A una parte de la saliva no se le realizó ningún procesado (SN). Una fracción fue autoclavada (SA) a 121 °C durante 30 minutos. Otra fracción fue centrifugada de nuevo a 16300 g durante 5 minutos y pasada por filtros de 0,45 µm de tamaño de poro para eliminar microorganismos (SF1). A su vez, parte de esta saliva se volvió a centrifugar en tubos *falcon* con filtro incorporado de 30 kDa (Amicon@Ultra-15 Centrifugal Filter Devices) a 2000g durante 20 minutos, con lo que se obtuvo una saliva libre de proteínas de gran tamaño, como las inmunoglobulinas (SF2). Las muestras de saliva sin procesar (SN), saliva autoclavada (SA) y salivas filtradas (SF1, SF2) de cada animal se fueron almacenando por separado a -80 °C.

Se llevó a cabo una incubación *in vitro* de 24 h de duración en tubos Hungate con un volumen total de 6 ml entre líquido ruminal y saliva, en proporción 1:2. Se empleó líquido ruminal fresco de 3 cabras canuladas en rumen distintas de las donantes de saliva, el cual se filtró con gasa y se incubó con cada tipo de saliva. De esta forma, la incubación siguió un diseño experimental 4x4x3 (4 cabras donantes de saliva x 4 tipos de saliva x 3 líquidos ruminales), a lo que se añadieron 6 tubos control (2 por cada líquido ruminal) con tampón bicarbonato en lugar de saliva. El sustrato de incubación consistió en 30 mg de heno de avena y 30 mg de concentrado, ambos molidos a 1 mm de diámetro. La incubación se mantuvo en anaerobiosis a 39°C. Durante la incubación, se midió la producción de gas a las 2, 4, 7, 10 y 24 h en base a valores de presión. Estas medidas fueron transformadas a volumen con la ley de los gases ideales. Se midió el pH de incubación inicial (0 h) y final (24 h). Al final de la incubación, se tomaron muestras para describir la fermentación ruminal en base a la determinación de la concentración de NH₃-N por espectrofotometría y de AGV por cromatografía de gases. El análisis estadístico consistió en un ANOVA cuyo factor fijo fue el tipo de saliva (SN vs. SA vs. SF1 vs. SF2), considerándose como efectos aleatorios los animales donantes de saliva y de líquido ruminal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incubación de líquido ruminal con distintas fracciones de saliva generó cambios considerables en la fermentación ruminal (Tabla 1). Pese a que el pH de partida fue similar en todos los tratamientos, los valores de pH al final de la incubación distaron notablemente al emplear una u otra saliva (más bajos con las salivas filtradas que con la SN y SA; $P < 0,01$). Estas diferencias en el pH pueden explicarse, en parte, por la mayor concentración de amonio al incubar con salivas SN y SA en lugar de las salivas SF1 y SF2 (hasta +35% más amonio con SN que con la saliva SF2; $P < 0,001$). Por el contrario, no se observaron diferencias en la concentración de AGV entre las salivas SN, SF2 y SA, siendo significativamente superior SF1 con respecto a las demás (+5%, +7% y +8% en comparación con SF2, SN y SA, respectivamente; $P < 0,001$). Los patrones de fermentación (en cuanto a producción de distintos AGV) del líquido ruminal son dispares al incubarse con unas salivas u otras. Concretamente, encontramos un patrón parecido entre los tratamientos SN y SA, con unas proporciones de ácido acético y propiónico y, por tanto, un ratio acético/propiónico (Ac/Pro) similares entre ellos. En el caso de los tratamientos SF1 y SF2, no se observan diferencias en el acético y el propiónico entre ellos, pero sí una proporción sustancialmente menor de acético y mayor de propiónico con respecto a las salivas SN y SA (de media, -8% acético y +23% propiónico en SF1 y SF2 con respecto a SN y SA; $P < 0,001$ en ambos casos). No se apreciaron diferencias en las proporciones de butírico y valérico pero sí en los ácidos grasos ramificados isobutírico e isovalérico (concentración relativa significativamente mayor en SN y SA, y la más baja en SF2; $P < 0,001$). La producción de gas resultó ser más alta en el líquido ruminal incubado con SF1 (+2%, +5% y +7% en comparación con SF2, SA y SN, respectivamente; $P < 0,001$). Los resultados denotan una gran semejanza entre el uso de saliva sin procesar ni filtrar (SN) y saliva autoclavada (SA). Esto, a priori, podría resultar contradictorio ya que entre una y otra solo comparten el componente iónico, mientras que la saliva SN con las dos filtradas compartirían, además, la fracción proteica. Las diferencias en la fermentación ruminal al incubar con saliva con y sin filtrar evidencian la importancia de las proteínas de la saliva en la regulación de la microbiota responsable de esa fermentación. Esta circunstancia es aún más manifiesta si tenemos en cuenta la mayor producción de gas y de AGV en la saliva SF1, lo que sugiere el posible papel que pueden tener las proteínas salivales de tamaño superior a 30 kDa, entre las que se incluyen las inmunoglobulinas, en la modulación de la microbiota ruminal, como se ha descrito previamente (Fouhse et al., 2017; Tsuruta et al., 2012). En la actualidad estamos llevando a cabo más ensayos *in vitro* con tiempos de exposición más prolongados para profundizar en el papel modulador de la saliva.

Tabla 1. Patrón de fermentación ruminal en incubación *in vitro* con saliva sin filtrar (SN), saliva filtrada por un tamaño de poro de 0,45 μm (SF1), saliva filtrada por un tamaño de poro de 30 kD (SF2) y saliva autoclavada (SA).

	SN	SF1	SF2	SA	EEM	Valor P
pH inicial	7,03	7,02	7,02	6,99	0,014	ns
pH final	6,51a	6,39b	6,41b	6,48a	0,021	**
Producción Gas, mL	11,54c	12,33a	12,08b	11,70bc	0,139	***
NH ₃ -N, mg/dL	35,38a	30,68b	26,23c	31,78ab	1,388	***
AGV, mM	103,67b	111,17a	105,61b	103,38b	1,095	***
Acético, %	61,30a	56,18b	57,18b	61,43a	0,439	***
Propiónico, %	21,44b	26,30a	25,66a	20,92b	0,434	***
Isobutírico, %	1,31a	1,16b	1,04c	1,25a	0,020	***
Butírico, %	12,06	12,71	12,83	12,54	0,232	ns
Isovalérico, %	2,19a	1,94b	1,70c	2,15a	0,050	***
Valérico, %	1,70	1,71	1,59	1,71	0,044	ns
Ac/Pro	2,98a	2,25b	2,35b	3,06a	0,052	***

EEM: Error estándar de la media; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; t: tendencia; ns no significativo. Dentro de una misma línea, letras distintas denotan diferencias significativas ($P < 0,05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apper-Bossard, E. 2010. Effects of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism and blood acid-base regulation in dairy cows receiving 2 contrasting levels of concentrate in diets. *J. Dairy Sci.* 93: 4196-4210
- Donaldson, G.P. et al. 2018. Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization. *Science.* 18;360(6390):795-800
- Duric, M. et al. 1994. Indirect measurement of saliva secretion in sheep fed diets of different structures and the effect of such diets on ruminal fluid kinetics and fermentation pattern. *Exp. Phy.* 79: 823-830.
- Foughse, J.M. et al. 2017. Host immune selection of rumen bacteria through salivary secretory IgA. *Frontiers in Microb.* 8:848.
- Macpherson, A.J. et al. 2012. The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA. *Immuno. Rev.* 245(1):132-46
- Tsuruta, T. et al. 2012. Commensal bacteria coated by secretory immunoglobulin A and immunoglobulin G in the gastrointestinal tract of pigs and calves. *Ani. Sci. J.* 83(12):799-804.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por MINECO AGL2017-86938-R1 y FPU16/01981.

EFFECT OF THE DIFFERENT FRACTIONS OF GOAT SALIVA ON RUMINAL FERMENTATION

ABSTRACT: Saliva plays a major role in buffering the rumen pH but its effect on the rumen microbial fermentation is unknown. The aim of this work was to assess *in vitro* the importance of the different fractions of saliva on rumen fermentation. Saliva was collected from 4 adult goats using bucal swabs. Saliva was divided into 4 fractions: i) unprocessed (SN), ii) autoclaved (SA), iii) filtrated through 0,45µm pore size (SF1) to eliminate microbiota and iv) further filtrated through 30 kDa filters to remove big proteins like immunoglobulins (SF2). All salivas from each animal were stored separately at -80°C. Salivas were then incubated 24h with ruminal fluid from 3 different goats. Gas pressure was measured throughout the incubation. pH was measured at 0h and 24h. Samples were taken at 24h to describe rumen fermentation. Final pH, NH₃-N and acetic/propionic ratio were higher with SN and SA than with filtrated salivas. However, filtrated fractions promoted a higher VFA and gas production compared with SN and SA, whereas SF1 had the greatest values. These results indicate that saliva, and in particular the protein fraction, plays a role on the modulation of the rumen microbial fermentation. These observations must be confirmed *in vivo* but open the possibility of a modulation of the rumen microbiome by the host.

Keywords: saliva, immunoglobulins, microbiota, ruminal fermentation