

ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA MEZCLA COMERCIAL DE ACEITES FUNCIONALES SOBRE LA FERMENTACIÓN “*IN VITRO*” DE CONTENIDO RUMINAL PROCEDENTE DE TERNEROS ALIMENTADOS CON RACIONES CONCENTRADAS

Seradj, A. R.¹, Torrent, J.², de la Fuente, G.¹, Balcells, J.¹

¹Departament de Ciència Animal ETSEA, Universitat de Lleida. 25198 Lleida. España. ²Oligo Basics, Cary, NC, Estados Unidos de América. balcells@ca.udl.cat

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, se ha analizado el efecto de diferentes aditivos alimentarios sobre el ecosistema ruminal con objeto de mejorar los procesos de fermentación y con ello la utilización digestiva de los componentes fibrosos mediante el control de las emisiones de metano y la excreción de nitrógeno (Patra y Saxena, 2009). Convencionalmente los procesos de fermentación ruminal han sido regulados mediante la utilización de sustancias antibióticas (i.e. ionóforos), cuya utilización ha sido limitada o prohibida dada su persistencia en el medio y su efecto colateral sobre la resistencia de ciertos patógenos. Por ello, ha sido necesario buscar sustancias alternativas más seguras que permitiesen también regular los procesos de fermentación en el rumen sin efectos residuales. Levin (1976) y Cowan (1999) demostraron que ciertos compuestos secundarios de las plantas eran capaces de ejercer un efecto antimicrobiano. Algunos de estos compuestos secundarios han sido probados con éxito como reguladores de los procesos de fermentación ruminal y/o como promotores de crecimiento en los animales de abasto. Entre ellos, los aceites funcionales se ha demostrado que pueden ejercer un efecto similar al de los antibióticos pero de forma totalmente inocua (Marino et al., 2013).

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar “*in vitro*” el impacto de una mezcla comercial de aceites funcionales sobre los procesos de fermentación ruminal y la emisión de metano, utilizando líquido ruminal de terneros alimentados con raciones concentradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se diseñó como un bloque completo al azar con 4 series de incubación *in vitro* (Theodorou et al., 1994) para evaluar el efecto de una mezcla comercial de aceites funcionales (compuestos de aceite de ricino y aceite de cáscara de castaña Oligobasics, USA LLC, Wilmington, DE) sobre la fermentación ruminal, la producción de metano y las poblaciones metanogénicas responsables de dicha emisión. Para ello, se utilizaron 24 botellas de 120 ml que se llenaron con muestras (600 mg) de las raciones (90% de un pienso comercial plus 10% de paja de cebada) que recibían los terneros donadores (4 animales/tandas de incubación) y 80 ml de una solución de incubación que incluía inóculo ruminal (obtenido después de filtrar contenido ruminal por doble gasa), solución mineral, tampón y solución reductora. En los frascos se añadieron aceites funcionales (FO; 500 µg/g MS de la ración basa), o no, (tratamiento control; CTR) y después se sellaron y se incubaron a 39±1 °C durante 24 horas. La presión del espacio de cabeza determinó y muestreó (0,1 ml) a intervalos de 2 h, hasta las 12 y a las 24 h tras el inicio del proceso de incubación para determinar la producción de gas y metano, en este último caso fue determinado por cromatografía de gases. La producción de gas se ajustó con el modelo: $y=a(1-e-b(t-c))$ (McDonald, 1981), en el cual “a” indica la producción potencial; “b” la ritmo fraccional de producción (ml/h) y “c” el tiempo de retraso (h). Tras 12 y 24 h, respectivamente, 2 botellas por tratamiento se abrieron para determinar las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃), (Chaney y Marbach, 1962), ácidos grasos volátiles (AGV; Jouany, 1982) y se procedió a la determinación de arqueas metanogénicas (AM) mediante qPCR. El ADN se extrajo utilizando un kit QIAamp y como cebadores específicos para determinar la abundancia absoluta de AM y también la abundancia relativa en relación al arqueas totales (2(-ΔCt)) se utilizaron los propuestos por Denman et al., (2007) y Øvreås y Torsvik (1998). El modelo de análisis consideró como factores fijos el efecto, bloque, tratamiento, tiempo de incubación así como sus interacciones. Los cálculos se realizaron mediante el paquete estadístico SAS (9.4). Las diferencias y tendencias significativas se declararon a niveles de P≤0,05 y 0,05<P≤0,10, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de aceites funcionales (FO) disminuyó numéricamente (Figura 1) los niveles de producción de gas (ml/g MS), aunque las diferencias en ningún caso alcanzaron relevancia estadística (196 vs. 200 para FO y CTR respectivamente, $P=0,12$). Tampoco se observaron interacciones significativas entre los tratamientos y el tiempo/periodo de incubación. Se observó una tendencia de los FO a reducir la producción de metano (13,5 vs 14,3; $P=0,06$) y la relación volumétrica (v/v) metano/gas total (0,09 vs 0,1 para FO y CTR respectivamente, $P=0,05$). Cuando las producciones de gas y CH_4 fueron modelizadas, la adición de FO no alteró ni el nivel (a) ni los ritmos (b) de producción ($P>0,05$) aunque sí incrementó los tiempos de retraso (c: 0,118 vs. 0,044 EMS 0,024, $P=0,04$). El incremento en los tiempos de retraso podría estar relacionado con la naturaleza grasa del tratamiento que dificultaría la interacción sustrato - microorganismo en el medio de cultivo (Devendra y Lewis, 1974).

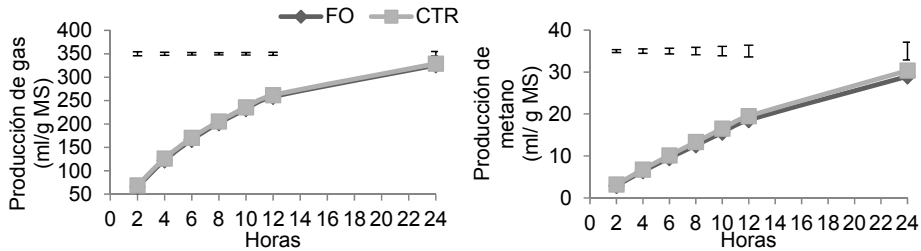


Figura 1. Producción de gas y metano a largo de incubación in vitro en el tratamiento control (CTR) y en el tratamiento con aceites funcionales (FO)

En Tabla 1 se presentan los resultados relativos a los parámetros de fermentación y en ella se aprecia como la adición de aceites funcionales incrementó los niveles de pH ($P<0,01$). Con respecto a la concentración de amoníaco, la interacción del tratamiento y las horas posteriores a la incubación sugiere que con FO se produce una reducción en la degradación de la proteína durante el transcurso del experimento (24 h; 312,2 vs 351,1 EMS 8,76 $P=0,05$ por FO y CTR, respectivamente). En concreto, si la adición de aceites funcionales limitó los procesos de fermentación microbiana, la menor liberación de AGVs explicaría los cambios de pH, y la limitación en los procesos de degradación proteica la liberación de NH_3 .

Tabla 1. Efecto de la inclusión de aceites funcionales (FO) en el pH, N amoniacal (N-NH_3), ácidos grasos volátiles (AGV) y las concertaciones molares sus principales componentes, la concentración absoluta de bacterias totales, arqueas metanogénicas (AM) y los valores relativos de AM en relación al cómputo total de arqueas.

	Tratamiento (Tr)		EMS	P valor		
	FO	CTR		Tr	H	Tr x Hora
pH	6,61 ^a	6,58 ^b	0,006	<0,01	<0,01	0,49
$\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/l)	284,4 ^b	305,3 ^a	5,95	0,02	<0,01	0,05
AGV (mM)	54,4	56,7	1,01	0,12	<0,01	0,49
Proporción de AGVs (mol/100 mol)						
Ácido Acético	45,4 ^b	46,4 ^a	0,37	0,05	<0,01	0,25
Ácido Propiónico	34,3 ^a	33,5 ^b	0,24	0,03	<0,01	0,15
Ácido Butírico	12,7	12,5	0,12	0,25	0,39	0,66
AM Absoluto ($\log_{10} \text{N}^\circ$ copias gen/g MF)	6,61	6,64	0,026	0,40	0,60	0,66
AM Relativo ($2^{(-\Delta\text{Ct})} \times 10^2$)	14,72 ^b	17,82 ^a	0,957	0,03	0,72	0,95

En una fila, medias con distinto superíndice presentan diferencias a $P<0,05$

La concentración/producción total de AGV no fue modificada por la presencia de aceites funcionales aunque sí lo fueron las proporciones molares de ácido acético y propiónico; efectivamente la presencia de FO en el medio redujo la producción de acético e incrementó la de propiónico ($P<0,05$); con ello se puede afirmar que la presencia en el medio de FO mejoraría la eficiencia de fermentación dado que el ácido propiónico es más eficientemente utilizado por el animal hospedador (Van Soest et al., 1991). No se detectaron cambios en la cuantificación absoluta (\log_{10} N° copias gen/g MF) de AM entre los tratamientos. Sin embargo, la abundancia relativa de AM en relación al contenido total de arqueas se redujo ($P<0,05$). En este sentido hay que señalar que una reducción en la disponibilidad de ácido acético y por tanto de actividad reductora (H^2) podría ser un factor limitante que explicase la reducción en la densidad de las AM (Chen y Wolin, 1979) aunque una hipotética toxicidad de FO frente a la población de arqueas metanogénicas no puede ser descartada (Seradj et al., 2014). En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que el uso de la mezcla comercial de aceites funcionales puede alterar los parámetros de fermentación hacia los cambios deseables (mayor valor de pH, disminución de la degradación de la proteína y mayor producción de propionato a expensas del acetato) y también reducir la producción de metano sin cambios indeseables en la fermentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chaney, A.L., Marbach, E.P. 1962. Clin. Chem. 8: 130-132.
- Chen, M., Wolin, M.J. 1979. Appl. Environ. Microb. 38: 72-77.
- Cowan, M.M. 1999. Clin. Microb. Rev. 12: 564-582.
- Denman, S.E., et al. 2007. FEMS Microbiol. Ecol. 62: 313-322.
- Devendra, C., Lewis, D. D. 1974. Ind. J. Anim. Sci. 44: 917-938.
- Jouany, J.P., 1982. Sci. Aliments. 2, 131-144.
- Levin, D.A., 1976. Ann. Rev. Ecol. Sys. 7 : 121-159.
- Marino, et al. 2013. J. Anim. Sci. 91: E-Suppl. 2.
- McDonald, I. 1981. J. Agric. Sci. Camb. 96: 251-256.
- Øvreås, L., Torsvik, V. 1998. Microb. Ecol. 36: 303-315.
- Patra, A.K., Saxena, J. 2009. International J. Gen. Molecul. Microb. 96: 363-375.
- Seradj, A.R., et al., 2014. Anim. Feed Sci. Technol. 197: 85-91.
- Theodorou, M.K., et al. 1994. Anim. Feed Sci. Tech. 48: 185-197.
- Van Soest, P.J., et al. 1991. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.

IN VITRO EFFECTS OF A COMMERCIAL BLEND OF FUNCTIONAL OILS ON FERMENTATION, METHANE PRODUCTION AND RESPONSIBLE METHANOGENIC ARCHAEA

ABSTRACT: A complete randomized block design trial with 4 in vitro incubation sets were prepared to evaluate the effect of a commercial blend of functional oils (FO; Oligo Basics, Brazil) on rumen fermentation, methane production and methanogenic archaea. Bottles were filled with concentrate diets and an incubation solution under a CO_2 stream. Sealed bottles were incubated for 24 h and either dosed with 500 μg of FO/gDM of basal diet or not (control). The headspace pressure was measured and sampled at 2 h intervals, up to 12 h and 24 h post incubation to determine gas and then methane concentration using GC. After DNA extraction, specific primers were used to determine absolute abundance of methanogenic archaea (MA) and the relative abundance of MA in relation to total archaea using qPCR. Bottles supplemented with FO showed a tendency (14.26 vs. 13.50) to decrease methane production and reduced the methane ratio (CH_4 /gas; 0.093 vs. 0.089; $P=0.05$), where the discrete lag time for gas production increased (0.04 vs.0.12; $P=0.047$). Addition of FO improved rumen fermentation, increasing molar proportion of propionate (33.5 vs. 34.3; $P=0.024$) and decreasing NH_3 -N concentration (305.3 vs. 284.4; $P=0.022$) and relative abundance of MA (17.8 vs. 14.7; $P=0.03$).

Keywords: fermentation, functional oil, methanogenic archaea