MODIFICACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* EN RESPUESTA A LA ADICIÓN DE PLANTAS MEDICINALES[1]

R. García – González, S. López, A. B. Rodríguez, M. Fernández y J. S. González
Dpto. Producción Animal I, Universidad de León, 24071 León

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales contienen multitud de compuestos químicos que pueden ser considerados como "agentes con actividad biológica", ya que pueden afectar a los procesos metabólicos en el organismo animal. El uso de estos productos es una realidad en las industrias Farmacéutica y de la Nutrición Animal y Humana.

Diferentes productos vegetales han sido identificados como potencialmente capaces de modificar favorablemente la fermentación ruminal (Greathead, 2003; Wallace y col., 2002; Evans y Martin, 2000)

En nuestro laboratorio se han ensayado más de 200 plantas medicinales, extractos vegetales o aceites esenciales (García – González y col., 2004), en un intento de identificar nuevos aditivos "naturales" de interés en la alimentación de los rumiantes. En este trabajo, se pretende establecer, mediante ensayos *in vitro*, la dosis óptima de cuatro de estas plantas cuando son empleadas como aditivos para inducir cambios en la fermentación ruminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las plantas medicinales ensayadas como aditivos fueron la tormentilla (*Potentilla erecta*), corteza de frángula (*Rhamnus frangula*), raíz de ruibarbo (*Rheum officinale*) y bulbo de ajo (*Allium sativum*)

Se realizaron cultivos in vitro de 24 h en viales de 120 ml. El sustrato empleado fue una mezcla de heno de alfalfa, heno de gramíneas y cebada (50:30:20) Las plantas medicinales fueron añadidas al sustrato de incubación en las proporciones de 0 (control), 5, 9, 14 o 18 g planta/100 g sustrato, de manera que el contenido final de materia seca (MS) en cada vial fue de 520 mg de la mezcla de sustrato y planta medicinal. Todos los componentes fueron molidos a 1 mm.

El líquido de rumen empleado como inóculo se obtuvo mezclando muestras de contenido ruminal extraídas de 3 ovejas provistas de cánula ruminal y filtrando esta mezcla a través de una gasa. El inóculo obtenido fue diluido en solución tamponada y reducida (Goering y Van Soest, 1970) en proporción 1:5.

En cada vial se dosificaron anaeróbicamente 50 ml de líquido ruminal diluido, posteriormente se cerraron con un tapón de goma, se sellaron con una cápsula de aluminio y se incubaron durante 24 horas a 39º C.

Se realizaron 2 series de incubaciones, en días diferentes. Cada uno de estos días se incubaron triplicados de cada tratamiento (4 plantas x 4 dosis), junto con controles (sin planta medicinal) y se empleó monensina sódica, en dosis 5 y 10 µM, como control positivo.

Tras la incubación, se midió la producción de gas acumulado en cada vial, empleando un transductor de presión (Bailey & Mackey Ltd., UK) acoplado, a través de una válvula de 3 vías, a una aguja y una jeringa. De esta manera se registró la presión y volumen de gas y se tomó una muestra del gas de fermentación que fue transferida a un tubo de vacío de 10 ml (Venoject®, Terumo Europe N.V., Bélgica) Inmediatamente, los viales se introdujeron en un baño de hielo para detener la

[1] **AGRADECIMIENTOS**: Trabajo financiado por la Junta de Castilla y León (Proyecto 29/03)

fermentación. Posteriormente, se tomó una muestra para análisis de los ácidos grasos volátiles (AGV) y se registró el pH. El residuo de la incubación se recolectó en crisoles filtrantes Pyrex® de poro nº 1 para calcular gravimétricamente la degradación de la MS y FND del sustrato. Las muestras de gas fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14 B equipado con columna 60/80 Carboxen™ 2.3 m x 3.2 mm y con detector de llama y acoplado a un integrador. Los AGV se analizaron por cromatografía de gases.

Los efectos de la adición de cada planta medicinal (comparación con el control y diferencias entre las dosis empleadas) se determinaron mediante ANOVA utilizando el programa SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla I. Valores medios de los parámetros de fermentación registrados tras 24 h de incubación. Cada planta medicinal se añadió en concentraciones de 5, 9, 14 o 18 g por 100 g de sustrato.

Planta / dosis	**Gas** ml	**DMS** %	**CH_4** µmol	**CH_4 /gas** ml/100 ml	**AGV** mmol	**Ac/Prop**
Control						
0	78,6 ^{a}	70,5 ^{a}	409 ^{a}	13,2 ^{a}	2,41 ^{a}	3,03 ^{a}
P. erecta						
5	77,5 ^{a}	67,9 ^{b}	380 ^{a}	12,9 ^{ab}	2,28 ^{b}	2,99 ^{a}
9	74,2 ^{b}	67,7 ^{b}	320 ^{b}	11,0 ^{b}	2,29 ^{b}	2,93 ^{a}
14	72,2 ^{b}	66,8 ^{b}	362 ^{ab}	12,7 ^{ab}	2,14 ^{c}	3,01 ^{a}
18	67,5 ^{c}	67,9 ^{b}	322 ^{b}	12,1 ^{ab}	1,99 ^{d}	2,92 ^{a}
EED	1,45	0,88	26,5	1,36	0,049	0,009
R. frangula						
5	76,3 ^{a}	70,4 ^{a}	320 ^{b}	10,6 ^{b}	2,39 ^{a}	2,44 ^{b}
9	73,3 ^{b}	68,2 ^{b}	284 ^{c}	9,8 ^{b}	2,40 ^{a}	2,20 ^{c}
14	69,7 ^{c}	68,1 ^{b}	227 ^{d}	8,3 ^{c}	2,20 ^{b}	2,01 ^{d}
18	62,9 ^{d}	69,4 ^{ab}	150 ^{e}	6,0 ^{d}	2,04 ^{c}	1,84 ^{e}
EED	1,43	0,90	17,3	0,38	0,044	0,072
R. officinale						
5	73,5 ^{b}	70,2 ^{a}	293 ^{b}	10,2 ^{b}	2,35 ^{a}	2,13 ^{b}
9	68,7 ^{c}	68,6 ^{bc}	166 ^{c}	6,1 ^{c}	2,23 ^{b}	1,78 ^{c}
14	63,3 ^{d}	67,6 ^{c}	118 ^{d}	4,8 ^{c}	2,01 ^{c}	1,69 ^{c}
18	61,6 ^{d}	69,4 ^{ab}	78 ^{e}	3,2 ^{d}	1,87 ^{d}	1,70 ^{c}
EED	1,44	0,55	18,2	0,67	0,003	0,101
A. sativum						
5	80,9 ^{ab}	71,2 ^{a}	530 ^{b}	16,6 ^{b}	2,49 ^{ab}	2,87 ^{ab}
9	82,8 ^{bc}	70,5 ^{a}	500 ^{b}	15,2 ^{ab}	2,65 ^{c}	2,78 ^{bc}
14	83,9 ^{c}	73,9 ^{b}	512 ^{b}	15,5 ^{ab}	2,62 ^{bc}	2,66 ^{cd}
18	82,7 ^{bc}	75,6 ^{c}	477 ^{ab}	14,5 ^{ab}	2,52 ^{abc}	2,52 ^{d}
EED	1,33	0,66	38,2	1,12	0,004	0,092
Monensina						
5 µM	66,5 ^{b}	65,4 ^{b}	333 ^{b}	12,9 ^{a}	2,18 ^{b}	1,99 ^{b}
10 µM	61,6 ^{c}	63,3 ^{c}	298 ^{b}	12,4 ^{a}	2,01 ^{c}	1,94 ^{b}
EED	3,29	0,69	21,6	1,57	0,065	0,090

$^{a, b, c, d, e}$ Dentro de cada columna y para cada planta o aditivo, los valores con diferente letra difieren significativamente entre sí o con el control ($P<0,05$)
EED: Error estándar de la diferencia

En estudios previos (García – González y col., 2004) se había detectado un efecto significativo sobre los parámetros de la fermentación ruminal *in vitro* al añadir la cuatro plantas medicinales en concentraciones de 13 g/100 g sustrato. Estos efectos vuelven a confirmarse en este trabajo.

R. frangula y *R. officinale* parecen provocar una disminución específica de la producción de CH_4, acompañada por un cambio en el perfil de los AGV derivados de la fermentación. Las dosis más bajas afectan sólo a estos dos parámetros. A medida que aumenta la dosis, también disminuye la producción de gas y AGV totales.

Con estas plantas se aprecia que la magnitud de la respuesta observada guarda una relación directa con la dosis empleada. La dosis más baja provoca cambios significativos en algunos de los parámetros considerados, y estos cambios se incrementan cuantitativamente a medida que aumenta la dosis.

Aunque no se ha aislado el compuesto químico responsable de estos efectos, cabe destacar que ambas plantas contienen diferentes derivados antraquinónicos, en una concentración variable, hasta un máximo de un 12%. En la hipótesis de que estos fuesen los principios responsables de estos efectos, significaría que dichas moléculas serían efectivas, modificando los parámetros de fermentación considerados, en las condiciones ensayadas, en dosis menores a 0,6% en el sustrato o 62 p.p.m. en el medio de cultivo. García – López y col. (1996) emplearon 9,10-antraquinona como aditivo en fermentaciones *in vitro* y detectaron cambios en el patrón de la fermentación del mismo signo que los aquí recogidos. Estos autores plantearon la hipótesis de que este compuesto actúa inhibiendo específicamente la metanogénesis.

Por todo ello, cabe pensar que estas plantas pueden actuar primariamente inhibiendo la metanogénesis, lo que, a su vez, provoca cambios en otros parámetros fermentativos. En este sentido, García – López y col. (1996) observaron que al emplear 9,10-antraquinona se acumula H_2 en el medio de cultivo, lo que llega a inhibir la fermentación acética.

Los efectos de *A. sativum* son de diferente signo, provocando un aumento significativo de la degradación del sustrato y de la producción de gas y AGV. Con este aditivo se aprecia una menor relación acetato/propionato, similar a lo observado por Busquet y col. (2003) empleando extracto de ajo en fermentadores continuos. En cambio, se incrementa la proporción de CH_4 en el gas de fermentación, efecto que fue independiente de la dosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A y Kamel C, 2003. Efecto del cinamaldehído y el extracto de ajo sobre la degradación de proteína y el perfil de fermentación en cultivos continuos. *ITEA*, Vol. Extra 24: 729–731.

Evans JD y Martin SA, 2000. Effects of Thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microb*., 41: 336–340.

García – González R, López S, Fernández M, Rodríguez AB y González JS, 2004. Screening the activity of medicinal plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, suppl. 1: 42–43.

García – López PM, Kung L y Odom JM, 1996. In vitro inhibition of microbial methane production by 9,10-antraquinona. *J. Anim. Sci.* 74: 2276–2284.

Goering MK y Van Soest PJ, 1970. Forage Fiber Analysis. *Agric. Handb. n. 379*. Agric. Res. Serv., USDA. Washington DC.

Greathead H, 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc*., 62: 279–290.

Wallace RJ, McEwan NR, McIntosh FM, Teferedegne B y Newbold CJ, 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*., 15: 1458–1468.