EFECTO DE COMPUESTOS FENÓLICOS SOBRE LA FERMENTACIÓN MICROBIANA RUMINAL Y EL FLUJO DE NUTRIENTES IN VITRO

L. Castillejos, S. Calsamiglia y A. Ferret
Dept. de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de plantas responsables del color y olor de plantas y especias. Se les atribuyen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, por lo que se están considerando como una posible alternativa natural a aditivos, como la monensina, prohibidos en alimentación animal.

Existen más de cien compuestos químicos individuales clasificados como aceites esenciales. Los compuestos fenólicos, como el eugenol (presente en el aceite de clavo) o el timol (presente en el aceite de orégano), son a menudo responsables de las propiedades antibacterianas de muchos aceites esenciales (Dormans y Deans, 2000). Aunque existen pocos estudios sobre el efecto de estos compuestos sobre la fermentación microbiana ruminal, parece ser que actúan sobre la flora microbiana del rumen disminuyendo la degradación de la proteína (McIntosh *et al.,* 2003) y modificando el perfil de fermentación del metabolismo ruminal (Evans y Martín, 2000).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de diferentes dosis de cinco compuestos fenólicos sobre la fermentación microbiana ruminal en dos estudios in vitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento 1

Los efectos de cinco compuestos fenólicos se evaluaron en una incubación de líquido ruminal de 24 h (Tilley & Terry, 1963) utilizando dos raciones diferentes: 60:40 forraje:concentrado (18% PB; 30% FND; 22% FAD) y 10:90 forraje:concentrado (16% PB; 25% FND; 11% FAD). Los tratamientos fueron: control (CTR), eugenol (EUG), guaiacol (GUA), limonene (LIM), timol (TIM) y vanillin (VAN), y se evaluaron 4 dosis de cada compuesto (5, 50, 500 y 5.000 mg/L). Las incubaciones se realizaron con líquido ruminal de una vaca canulada alimentada con una ración 60:40 forraje:concentrado y tampón bicarbonato-fosfato (McDougall, 1948). Se incubaron 0,5 g de ración en 50 mL de líquido ruminal diluido durante 24 h a 39ºC. Después de 24 h se determinó el pH ruminal y se recogieron muestras para determinar la concentración de N amoniacal y ácidos grasos volátiles (AGV). Los compuestos se evaluaron por duplicado en cada ración, y las fermentaciones se replicaron en dos días diferentes.

Experimento 2

Se utilizaron 8 fermentadores (1320 ml) de doble flujo continuo, desarrollados por Hoover *et al.* (1976), en tres periodos experimentales consecutivos de 9 días cada uno (6 días de adaptación y 3 días de muestreo). La ración contenía (% MS) heno de alfalfa (60,3%), harina de maíz (17,2%), harina de cebada (12,2%), harina de soja (9,7%), sal (0,34 %), fosfato de sodio (0,21%) y una mezcla de vitaminas y minerales (0,05%). Los fermentadores fueron dosificados con 95 g/d de MS, suministrados en tres tomas diarias iguales a intervalos de 8 horas (0800; 1600; 2400). Los tratamientos fueron: control (CTR), 5 mg/L (T5), 50 mg/L (T50) y 500

mg/L (T500) de timol, 5 mg/L (E5), 50 mg/L (E50) y 500 mg/L (E500) de eugenol, y 10 mg/L de monensina (MON). Los tratamientos se dosificaron directamente en el líquido ruminal de cada fermentador un minuto antes de cada comida.

Las condiciones de fermentación se mantuvieron constantes: Tª 39ºC; pH 6,4; y ritmo de paso de la fracción líquida y sólida a 10 y 5%/h, respectivamente. El primer día de cada periodo, los fermentadores se inocularon con líquido ruminal de una vaca canulada alimentada con una ración 60:40 forraje:concentrado. Durante los tres últimos días de muestreo se recogieron muestras de líquido ruminal filtrado de cada fermentador dos horas después de la alimentación de la mañana (10:00) para determinar la concentración de AGV. Para analizar la evolución del metabolismo nitrogenado, se recogieron muestras de líquido ruminal filtrado a las 0, 2, 4 y 6 horas después de la alimentación de la mañana, para determinar el N soluble en ácido tricloroacético, el N soluble en ácido túngstico, y el N amoniacal. Estas fracciones de nitrógeno se utilizaron para calcular la concentración de N LPep (péptidos grandes), N SPep+AA (péptidos pequeños y amino ácidos) y N amoniacal.

Los resultados de ambos experimentos se analizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED del SAS (1996) para medidas repetidas (Littell *et al.,* 1998). El día se considero como efecto bloque en el experimento 1 y el periodo en el experimento 2. Las diferencias entre los tratamiento y el CTR se determinaron usando el test de comparación múltiple de Dunnett.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1

Se comentarán los efectos más relevantes de cada compuesto según la dosis y la ración y se presenta la Tabla 1, con los resultados del EUG en la ración 60:40, como referencia numérico de los parámetros analizados.

La dosis 5.000 mg/L de los cinco compuestos inhibió la concentración total de AGV e incrementó el pH final en ambas raciones, sugiriendo que esta dosis fue tóxica para las bacterias ruminales.

En la ración 60:40, el EUG a 5 mg/L tendió ($P < 0,10$) a disminuir la proporción de acetato y la relación acetato:propionato, a 500 mg/L disminuyó la proporción de propionato y AGV ramificados, y a 50 y 500 mg/L tendió ($P < 0,10$) a disminuir la concentración de N amoniacal (Tabla 1). El GUA a 500 mg/L también redujo la concentración de N amoniacal y la proporción de acetato. La VAN a 500 mg/L redujo la proporción de acetato.

Tabla 1. Efecto del eugenol sobre el pH, la concentración de N amoniacal y el perfil de AGV sobre una ración 60:40 en fermentaciones de 24 h.

	Dosis					
	0	5	50	500	5.000	EE
pH	6,46	6,42	6,43	6,56	7,35*	0,08
N amoniacal	21,9	19,9	17,1†	16,9†	10,4*	1,94
AGV Totales, mM	140,4	134,8	137,0	133,4	66,1*	3,95
Ramificados, mM	3,02	3,03	3,01	2,51*	1,31*	0,08
AGV, mol/100mol						
Acetato	64,9	63,8*	64,0	65,1	64,7	0,46
Propionato	20,6	21,0	20,9	19,8*	21,0	0,29
Acetato:Propionato	3,55	3,36†	3,38	3,66	3,45	0,08

* Medias con diferencias significativas ($P < 0,05$)

† Medias con diferencias significativas ($P < 0,10$)

En la ración 10:90, todas las dosis de GUA incrementaron la concentración de N amoniacal y a 5 mg/L tendió (P < 0,10) a incrementar el pH ruminal. El LIM a 5, 500 y 5.000 mg/L, y el TIM a 5 y 50 mg/L también incrementaron el pH ruminal. La VAN a 5, 50 y 500 mg/L redujo la proporción de propionato e incrementó la proporción de acetato, y a 50 mg/L incrementó la concentración total de AGV, N amoniacal y AGV ramificados.

Experimento 2

La MON y T500 redujeron la digestión de MS, MO, FND y FAD. T500 y E500 redujeron la concentración total de AGV. La MON, T500 y E500 redujeron la proporción de acetato, la concentración de AGV ramificados y la relación acetato:propionato, e incrementaron la proporción de propionato. Además T500 y E500 incrementaron la proporción de butirato. Sin embargo, T500 redujo la proporción de valerato y E500 la incrementó. T5 tendió (P < 0,10) a reducir la proporción de acetato y a incrementar la proporción de butirato, sin afectar a la concentración total de AGV ni a la digestión de los nutrientes. La concentración de N peptídico se incrementó en T5, T500 y E500, sugiriendo que la proteolisis se estimuló o la peptidolisis se inhibió. La acumulación de N AA sugiere que la proteolisis y la peptidolisis se estimularon en T500. La concentración de N amoniacal tendió a incrementar con la MON.

Tabla 2. Efecto de timol, eugenol y monensina sobre el perfil de AGV y la concentración de las fracciones nitrogenadas en cultivo continuo.

	Tratamientos					
	Control	T5	T500	E500	MON	EE
AGV Totales, mM	105,5	102,5	52,8*	90,15*	103,7	4,32
Ramificados, mM	2,96	2,86	0,11*	0,54*	0,97*	0,57
AGV, mol/100mol						
Acetato	69,9	65,6†	51,6*	58,3*	48,9*	1,50
Propionato	15,8	16,9	20,0*	22,9*	42,3*	1,24
Butirato	9,01	11,7*	25,6*	14,4*	4,69*	0,88
Valerato	2,79	2,70	2,50*	3,73*	3,13	0,26
Acetato:Propionato	4,42	3,92	2,58*	2,57*	16,0*	0,31
Fracciones, mg/100 mL						
N peptídico	5,14	7,49*	7,23*	7,25*	6,49	0,75
N AA	4,86	3,73	9,66*	4,97	4,15	0,61
N amoniacal	11,7	13,4	10,7	11,6	16,9†	1,97

* Medias con diferencias significativas (P < 0,05)

† Medias con diferencias significativas (P < 0,10)

CONCLUSIONES

Algunos compuestos fenólicos demostraron tener actividad antimicrobiana al disminuir la concentración total de AGV e inhibir la digestión de los nutrientes. A dosis menores, modificaron el perfil AGV, inhibieron el metabolismo N y modularon el pH ruminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dormans, H. J. D. y S. G. Deans. 2000. J. Appl. Microbiol. 88:308-316.

Evans,J. D. y S. A. Martín. 2000. Curr. Microbiol. 41:336-340.

Hoover, W. H., B. A. Crooker y C. J. Sniffen. 1976. J. Anim. Sci.43:528-534.

Litell, R. C., P. R. Henry y C. B. Ammerman. 1996. SAS Institute inc., Cary, NC.

McDougall, E. I. 1948. Biochem. J. 43:99-109.

McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, y C. J. Newbold. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69:5011-5014.

Tilley, J. M. A. y R. A. Terry. 1963. J. Brit. Grassland Soc. 18:104-111.