

## EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO DE ACEITES ESENCIALES SOBRE LA FERMENTACIÓN MICROBIANA RUMINAL

Castillejos, L. <sup>1</sup>, Calsamiglia, S. <sup>1</sup>, Martín-Tereso, J. <sup>2</sup>, ter Wijlen, H. <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra. Email: lcastillejos@diamondv.com

<sup>2</sup>Nutreco Ruminant Research, 5830AE Boxmeer, Holanda.

### INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son combinaciones de metabolitos secundarios vegetales que se obtienen al destilar plantas y especias. Muchos de estos aceites han demostrado ser eficaces en la inhibición de microorganismos (Dorman y Deans, 2000), lo que justifica sus aplicaciones en medicina tradicional y como conservantes de alimentos. Por estas propiedades, los aceites esenciales están siendo considerados como una de las posibles alternativas naturales a los antibióticos promotores del crecimiento, tras la prohibición de su uso para alimentación animal en la Unión Europea a principios del 2006.

Aunque existen pocos estudios sobre los aceites esenciales como moduladores de la fermentación ruminal (Oh *et al.*, 1967; 1968), recientemente se han publicado numerosos trabajos de investigación sobre los efectos de los aceites esenciales y sus principios activos (Busquet *et al.*, 2006; Cardozo *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2006). La composición en principios activos de los aceites esenciales es muy variable, cualitativa y cuantitativamente según las especies y variedades vegetales, las condiciones de cultivo y el proceso de extracción. Esta amplia heterogeneidad hace que evaluar el efecto de los aceites esenciales resulte realmente complejo (Calsamiglia *et al.*, 2006).

El objetivo de este estudio fue evaluar in vitro el efecto de diez aceites esenciales sobre la fermentación microbiana ruminal.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Los efectos de diez aceites esenciales se evaluaron en una incubación de líquido ruminal de 24 h (Tilley & Terry, 1963). Como sustrato se utilizó una ración formulada emulando una dieta de vacuno de cebo, 10:90 forraje:concentrado (16.1% PB; 32.1% FND; 16.8% FAD). Los tratamientos fueron: un control negativo (CTR), un control positivo (MON, 10 mg/L de monensina), y aceites de Ajedrea (*Satureja montana*), Árbol de té (*Melaleuca alternifolia*), Clavo (*Eugenia caryophyllus*), Hisopo (*Hyssopus officinalis*), Lavanda (*Lavanda officinalis*), Lavandín (*Lavanda hybrida*), Orégano (*Origanum vulgare*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), Salvia (*Salvia officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*). Los aceites se evaluaron en 3 dosis (5, 50, 500 mg/L). Tres vacas con cánula ruminal del Centro Experimental de Rumiantes de Nutreco (Holanda), fueron utilizadas para obtener líquido ruminal. Los animales consumían una ración base de silo de maíz y silo de hierba suplementada con pienso compuesto (aprox. 40%). Se incubaron a 39°C porciones de 0,5 g de ración en 50 mL de líquido ruminal tamponado con una solución bicarbonato-fosfato (McDougall, 1948) y ajustado a pH 6.5. Después de 24 h se midió el pH y se recogieron muestras para analizar la concentración de N amoniacal y ácidos grasos volátiles (AGV). Los tratamientos se evaluaron por triplicado y las fermentaciones se replicaron en dos días diferentes.

Los resultados del experimento se analizaron como un diseño de bloques al azar utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (1996). El día se consideró como efecto bloque. Las diferencias entre los tratamientos y el CTR se determinaron usando el test de comparación múltiple de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El criterio de evaluación fue la mejora de las eficiencias energética y proteica, según el incremento de la concentración de AGV totales y la proporción de propiónico respecto a acético, y la reducción de la concentración de nitrógeno amoniacal. El efecto de los aceites esenciales sobre la fermentación ruminal dependió de la dosis. Se comentarán los resultados significativos ( $P < 0,05$ ) en relación al tratamiento CTR. Los resultados de los aceites de Orégano y Clavo se presentan en las Tablas 1 y 2 a modo de ejemplo.

La monensina, como control positivo, incrementó en todas las incubaciones la proporción de propionato y disminuyó la relación acetato:propionato, en coherencia con estudios previos (Russell y Strobel, 1989). La monensina también incrementó la concentración total de ácidos grasos volátiles (AGV) (entre 14 y 43%), la proporción de valerato, y el pH ruminal (entre 0,17 y 0,19), y además redujo el N amoniacal (entre 15 y 29%) y la proporción de acetato y butirato.

Las tres dosis de aceite de Tomillo incrementaron la concentración total de AGV (entre 36 y 47%) y disminuyeron la concentración de N amoniacal (entre 11 y 17%), aunque también redujeron el pH final de la fermentación (entre 0,12 y 0,16).

Todas las dosis de aceite de Ajedrea redujeron la concentración de N amoniacal (entre 18 y 30%). Sin embargo, también redujeron el pH ruminal después de 24 horas de incubación (entre 0,11 y 0,27) y aumentaron la proporción de acetato. Únicamente, las dosis 5 y 50 de Ajedrea incrementaron la concentración de AGV totales (35 y 25% respectivamente), aunque en menor proporción que la monensina y el aceite de tomillo. El aceite de Ajedrea a 500 mg/L no incrementó significativamente la concentración de AGV totales, pero sí incrementó la proporción de acetato y de propionato, y disminuyó la proporción de butirato.

Ninguna de las tres dosis del aceite de Lavanda modificó el pH, el N amoniacal, ni la concentración total de AGV. Únicamente la dosis 50 tendió a incrementar ( $P < 0,10$ ) la proporción de acetato y la dosis 500 disminuyó la proporción de butirato.

El aceite de Lavandín a 50 mg/L incrementó la proporción de acetato y disminuyó la proporción de butirato. Por el contrario, la dosis 500 incrementó la proporción de propionato, y también disminuyó la proporción de butirato. Sin embargo, todas las dosis de Lavandín disminuyeron la concentración de AGV ramificados (entre 27 y 29 %) y la concentración total de AGV totales (entre 26 y 27 %).

El aceite de Romero no modificó el pH ruminal, el N amoniacal, ni la concentración total de AGV. Sin embargo, la dosis 500 incrementó la proporción de propionato y valerato, y redujo la proporción de acetato y butirato, y la relación acetato:propionato, además tendió a reducir ( $P < 0,10$ ) la concentración de AGV ramificados (18%).

El aceite de Hisopo tampoco modificó el pH ruminal, el N amoniacal, ni la concentración total de AGV. Al igual que el aceite de Romero, la dosis 500 incrementó la proporción de propionato, y redujo la proporción de acetato y butirato, reduciendo la relación acetato:propionato.

El aceite de Salvia a 5 mg/L tendió a incrementar ( $P < 0,10$ ) el pH ruminal (0,04) y la dosis 50 incrementó la concentración de N amoniacal (18%). De nuevo, la dosis 500 incrementó la proporción de propionato y valerato, y redujo la proporción de acetato y de butirato, reduciendo la relación acetato:propionato.

Tabla 1. Efecto del aceite de Orégano sobre el pH, el N amoniacal y el perfil de AGV

	Tratamientos					
	CTR	5	50	500	MON	EE
pH	5,71	5,69	5,70	6,08*	5,88*	0,01
NH <sub>3</sub> , mg/100ml	45,6	49,1	48,8	29,6*	36,7*	2,12
AGV Totales, mM	122,6	170,2*	191,1*	101,2*	139,4 <sup>†</sup>	7,18
Ramificados, mM	2,37	2,37	2,40	2,14*	2,45 <sup>†</sup>	0,03
AGV, mol/100mol						
Acetato	60,3	60,2	60,1	61,5*	54,8*	0,17
Propionato	20,4	20,3	20,5	15,5*	28,7*	0,18
Butirato	15,0	15,1	15,0	18,5*	11,4*	0,16
Valerato	1,95	1,97	2,00	2,38*	2,66*	0,03
Acetato:Propionato	2,96	2,96	2,93	3,98*	1,91*	0,03

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

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

El aceite de Árbol de té a 500 mg/L, incrementó la proporción de propionato y valerato, y redujo la proporción de acetato y butirato, reduciendo la relación acetato:propionato.

Las dosis 5 y 50 de aceite de Orégano incrementaron la concentración de AGV totales (39 y 56 %, respectivamente). Sin embargo, a 500 mg/L inhibió la fermentación ruminal disminuyendo la concentración total de AGV (18%), de N amoniacal (35%) y de AGV ramificados (10%), y la proporción de propionato, e incrementando el pH ruminal (0,37), la proporción de acetato, de butirato y de valerato y la relación acetato:propionato.

Las tres dosis de aceite de Clavo incrementaron la concentración total de AGV (entre 33 y 52%), y la dosis 50 incrementó la concentración de N amoniacal (7%). Sin embargo, de nuevo, la dosis 500 fue la óptima para este aceite esencial. A 500 mg/L el aceite de Clavo incrementó la proporción de propionato y valerato, y redujo la proporción de acetato y butirato, la relación acetato:propionato y la concentración de AGV ramificados (3%).

Tabla 2. Efecto del aceite de Clavo sobre el pH, la concentración de N amoniacal y el perfil de AGV

	Tratamientos					
	CTR	5	50	500	MON	EE
pH	5,71	5,69	5,70	5,87*	5,88*	0,01
NH <sub>3</sub> , mg/100ml	45,6	44,9	48,5*	44,1	36,7*	1,07
AGV Totales, mM	122,6	162,8*	186,7*	174,7*	139,4	10,5
Ramificados, mM	2,37	2,39	2,37	2,29*	2,45*	0,02
AGV, mol/100mol						
Acetato	60,3	60,3	60,3	59,4*	54,8*	0,15
Propionato	20,4	20,4	20,5	22,6*	28,7*	0,18
Butirato	15,0	15,0	14,9	13,4*	11,4*	0,14
Valerato	1,95	1,97	1,97	2,40*	2,66*	0,03
Acetato:Propionato	2,96	2,96	2,95	2,63*	1,91*	0,02

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

## CONCLUSIONES

La mayoría de estos aceites esenciales afectó positivamente a la fermentación ruminal excepto el aceite de Lavanda que no la modificó, y el aceite de Lavandín y la dosis 500 del aceite de Orégano que la inhibieron. Sin embargo, la dosis 5 y 50 del aceite de Orégano incrementaron la concentración de AGV totales. El aceite de Tomillo incrementó la concentración de AGV totales y disminuyó la concentración de N amoniacal, aunque disminuyó el pH ruminal. El aceite de Ajedrea también incrementó la concentración de AGV totales y disminuyó la concentración de N amoniacal, aunque incrementó la proporción de acetato y también disminuyó el pH ruminal. La dosis 500 del aceite de Árbol de té, Clavo, Hisopo, Romero y Salvia disminuyeron la relación acetato:propionato. La dosis 500 de aceite de Clavo fue la única que incrementó el pH ruminal sin reducir la concentración de AGV. La mayoría de las muestras de aceites esenciales evaluadas bajo estas condiciones in vitro estimuló la fermentación ruminal, mejorando la eficacia energética y proteica de la fermentación ruminal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, C. Kamel. 2006. J. Dairy Sci. 89:761-771.  
 Cardozo, P., S. Calsamiglia, A. Ferret, C. Kamel. 2005. J. Anim. Sci. 83:2572-2579.  
 Calsamiglia, S., L. Castillejos, M. Busquet. 2006. Nottingham, UK.  
 Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret. 2006. J. Dairy Sci. 89:2649-2658.  
 Dormans, H. J. D., S. G. Deans. 2000. J. Appl. Microbiol. 88:308-316.  
 McDougall, E. I. 1948. Biochem. J. 43:99-109.  
 Oh, H. K., T. Sakai, M. B. Jones, W. M. Longhurst. 1967. Appl. Microbiol. 15:777-784.  
 Oh, H. K., M. B. Jones, W. M. Longhurst. 1968. Appl. Microbiol. 16:39-44.  
 Russell, J. B., H. J., Strobel. 1989. Appl. Environ. Microbiol. 55:1-6.  
 Tilley, J. M. A., R. A., Terry. 1963. J. Brit. Grassland Soc. 18:104-111.