

SELECCIÓN DE ADITIVOS FITOGÉNICOS PARA REDUCIR LA METANOGÉNESIS RUMINAL¹

Bodas, R.¹, López, S., Fernández, M., García-González, R., Wallace, R.J.², González, J.S.
Dpto. Producción Animal. Universidad de León. 24071 León. e-mail: s.lopez@unileon.es

¹ ETS Ingenierías Agrarias. Universidad de Valladolid. 34004 Palencia.

² Rowett Research Institute. Aberdeen (Reino Unido)

INTRODUCCIÓN

En la última década se ha intensificado la investigación sobre el posible uso de plantas medicinales y sus derivados como aditivos alternativos a los antibióticos, para mejorar la eficiencia digestiva de los alimentos, así como el bienestar y el rendimiento productivo de los animales (Greathead, 2003). Este ha sido un tema de investigación prioritario en los últimos programas marco de I+D de la Unión Europea (UE). En este contexto, el proyecto de investigación Rumen-Up, financiado por la UE, tenía como principal objetivo el descubrimiento de especies vegetales o aditivos fitogénicos con los que fuese posible modificar la fermentación ruminal para obtener determinados efectos, tales como la reducción del número de protozoos, la inhibición de la proteólisis o la disminución de la formación de metano. El interés de dichos efectos es indudable por sus beneficios económicos y medioambientales (Teferedegne, 2000).

En una primera fase, la selección de posibles candidatos que pudiesen inducir alguno de los efectos pretendidos se realizó mediante ensayos *screening*, basados en pruebas in vitro sencillas, selectivas, de fácil interpretación y de bajo coste que tienen una utilidad indiscutible con objeto de probar un amplio número de candidatos en un corto espacio de tiempo (Borris, 1996).

En este artículo se presentan los resultados obtenidos en una prueba de screening en la que se ensayaron 450 especies vegetales como posibles aditivos fitogénicos para reducir la producción de metano en la fermentación ruminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de las distintas especies de plantas fueron proporcionadas por los grupos participantes en el proyecto Rumen-Up (Rowett Research Institute, Universidad de Hohemheim, Universidad de Reading, Alltech, Crina y Universidad de León). Para su selección se utilizó la información disponible sobre todas y cada una de estas especies en la bibliografía, así como la aportada por especialistas en botánica. La mayoría de las muestras fueron recogidas directamente en el campo, aunque algunas de ellas fueron adquiridas en establecimientos especializados (en particular algunas plantas medicinales o especies comercializadas para su uso en fitoterapia y alimentación humanas). La lista de las especies vegetales que constituyeron esta colección está disponible en la siguiente dirección de internet: http://www.rowett.ac.uk/rumen_up/. Las plantas o partes de plantas fueron secadas en estufa a 40° C y posteriormente molidas en molino de martillos de tipo Culatti por malla de 1 mm y conservadas en envases herméticos y aislados de la luz.

Los cultivos in vitro se llevaron a cabo en viales de vidrio de 120 ml. El sustrato de fermentación empleado fue una mezcla de heno de alfalfa (500 g/kg), heno de gramíneas (400 g/kg) y cebada (100 g/kg), finamente molida y homogeneizada en molino de martillos tipo Culatti (malla de 1 mm). La composición química de esta mezcla fue la siguiente (por kg de MS): 921 g MO, 450 g FND y 133 g PB.

Para los cultivos discontinuos de microorganismos del rumen se empleó el medio líquido descrito por Menke y Steingass (1988), sin tripticasa. Este medio se mantuvo a 39° C y fue reducido mediante gaseado continuo con CO₂. El líquido de rumen empleado como inóculo se obtuvo de ovejas adultas de raza merina, provistas de una cánula ruminal y alimentadas con heno de alfalfa. Una vez obtenido y filtrado el líquido ruminal se mezcló en el medio de cultivo, previamente preparado, en proporción 1:4 (v:v).

¹ Proyecto de la Unión Europea QLK5-CT-2001-00992 (Rumen-Up)

Se incubaron tres viales por cada aditivo a ensayar. En cada vial se pesaron 450 mg de materia seca del sustrato y la cantidad correspondiente de aditivo (50 mg) y se dosificaron 50 ml de líquido ruminal diluido (10 ml líquido ruminal + 40 ml medio de cultivo). En cada tanda de incubación se incluyeron los correspondientes viales control, que contenían 450 mg de MS de sustrato sin aditivo. Los parámetros medidos al cabo de 24 h de incubación fueron los siguientes: producción de gas de fermentación a partir del aumento de presión registrado en el espacio de cabeza del vial (se utilizó un transductor); concentración de metano en el gas y de ácidos grasos volátiles (AGV) en el medio de cultivo (ambos mediante cromatografía de gases) y degradación de MS del sustrato una vez que todo el contenido de los viales fue filtrado en crisoles de placa porosa. Las producciones (al cabo de 24 h de incubación) de gas de fermentación, metano y AGV se expresaron en mmol por g de MS incubada.

Las comparaciones se establecieron, para cada uno de estos parámetros, entre los valores medios obtenidos de los tres viales que contenían cada aditivo con los valores medios de los viales control de la tanda de incubación correspondiente. La comparación entre medias y el nivel de significación estadística se estableció mediante un test *t*-Student. El efecto de cada planta sobre un determinado parámetro de fermentación o degradación de sustrato se cuantificó como la diferencia entre el valor medio de los viales con aditivo y el de los viales control (aumento o disminución), expresada como porcentaje del valor medio registrado en los viales control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el efecto de la adición de las 450 plantas ensayadas sobre el contenido en metano en el gas de fermentación. Dicho efecto se expresa como porcentaje de aumento o disminución relativo con respecto al control. La mayoría de los puntos se encuentran en el intervalo $\pm 10\%$ (entre un aumento y una disminución de un 10%). Puede observarse que hay un número importante de puntos que se sitúan por debajo del 10%, indicando que éstas son las muestras que potencialmente pueden provocar un efecto interesante sobre la producción de metano.

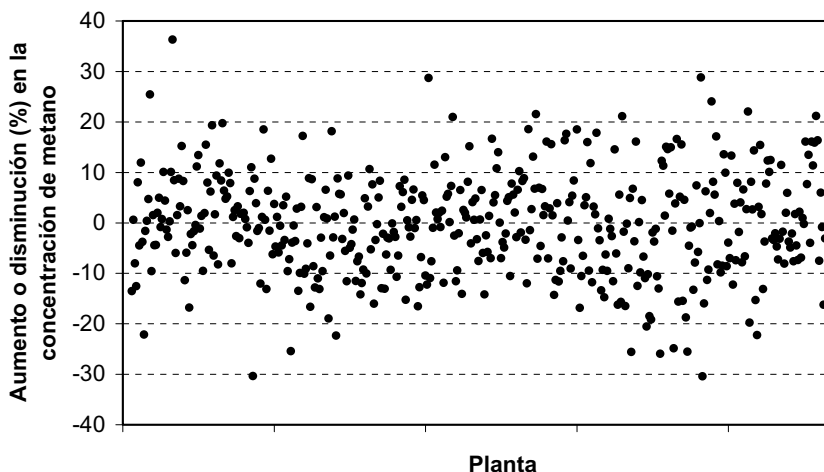


Figura 1. Efecto sobre el contenido de metano en el gas de fermentación.

En la Figura 2 se muestra la distribución de frecuencias de las 450 plantas ensayadas teniendo en cuenta el efecto observado sobre la producción de metano tras 24 h de fermentación *in vitro*. Las frecuencias, que son mayores en el centro (plantas con poco o ningún efecto) y se van haciendo menores hacia los extremos de la gráfica (plantas que causaron incrementos o disminuciones en la producción de metano), siguieron una

distribución similar en todos los parámetros estudiados. De todas las plantas estudiadas, doce de ellas (un 2,6% del total) tuvieron un efecto depresor de la producción de metano superior al 20% (en la gráfica, valores menores de -20).

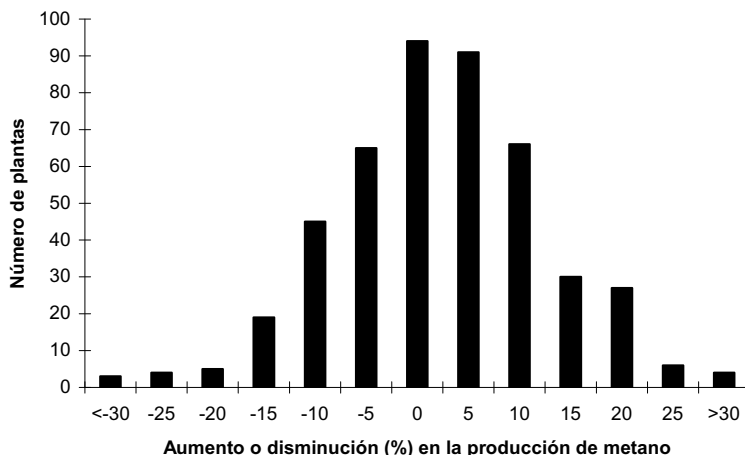


Figura 2. Histograma del efecto sobre la producción de metano tras 24 h de fermentación con respecto al control.

La actividad y concentración de los compuestos activos de las plantas puede verse afectada por diversos factores, tales como las condiciones climatológicas, el lugar de recogida o la época del año (Wink, 1999). Asimismo, dada la naturaleza de las pruebas *screening*, es posible que se detecten falsos positivos, por lo que centramos nuestra atención en aquellas muestras que, en principio, habían provocado una disminución acusada (superior al 20%) en la producción de metano. Partiendo de esta información, se examinaron los efectos de la adición de estas plantas sobre otros parámetros de fermentación (degradación de sustrato, producción de AGV) para descartar aquellas especies que pudieran tener un efecto inhibitor inespecífico de la fermentación ruminal. A partir de los resultados obtenidos en la prueba de *screening*, se seleccionaron seis especies vegetales que mostraron un efecto anti-metanogénico significativo sin inhibir la fermentación de sustrato. Estas especies fueron *Carduus pycnocephalus*, *Populus tremula*, *Prunus avium*, *Quercus robur*, *Rheum nobile* y *Salix caprea*. Los resultados de investigación que demuestran sus efectos sobre la metanogénesis ruminal están protegidos por la patente WO/2005/099729.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borris, R.P., 1996. Natural products research: Perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.* 51, 29-38.
- Greathead, H., 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 279-290.
- Menke, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28, 7-55.
- Teferedegne, B., 2000. New perspectives on the use of tropical plants to improve ruminant nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 209-214.
- Wink, M., 1999. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: Wink, M. (Ed.), *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology*, Sheffield Academic Press, Sheffield, U.K., pp. 1-16.