

FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* EN PRESENCIA DE MONENSINA: EFECTO DE LA ADAPTACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS RUMINALES DEL INÓCULO A LA MONENSINA*

Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Giraldo, L.A., Ramos, S., Martínez M.E. y Carro, M.D.¹
Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León. correo electrónico: mdcart@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Los cultivos no renovados de microorganismos ruminales se han utilizado ampliamente en los últimos años como un sistema *in vitro* útil para investigar los efectos de diferentes aditivos sobre la fermentación ruminal (Carro *et al.*, 2005). Entre los factores que pueden afectar a la respuesta observada destaca por su importancia las características del fluido ruminal que se utiliza como inóculo para los cultivos. En este sentido, existe cierta controversia sobre si el hecho de que el inóculo haya estado en contacto con el aditivo que se investiga puede afectar a los resultados obtenidos. El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de dos dosis de monensina sódica sobre la fermentación ruminal *in vitro* de un sustrato con un elevado contenido en concentrado cuando se utilizó como inóculo fluido ruminal de terneros en cebo que habían recibido monensina sódica en el pienso o que no habían recibido ningún aditivo. El experimento se llevó a cabo en el año 2005, antes de la entrada en vigor de la prohibición de utilización de monensina sódica como aditivo en la alimentación de los terneros en cebo.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se llevó a cabo utilizando un sistema de cultivos discontinuos de microorganismos ruminales. Como sustrato de incubación se utilizó una mezcla 85:15 de concentrado y paja de cebada, que contenía 356 de fibra neutro detergente y 158 g de proteína bruta/kg de materia seca (MS). El fluido ruminal se obtuvo de 8 terneros, 4 de los cuales habían recibido monensina sódica en el pienso (30 ppm) durante cuatro meses antes de obtener el fluido ruminal. El contenido ruminal se obtuvo tras el sacrificio de los animales en el matadero y se transportó en termos al laboratorio, dónde fue filtrado antes de su procesado.

Para la incubación se utilizaron botellas de vidrio de 120 ml de capacidad y en el interior de cada una se pesaron 400 mg de MS de sustrato. Los tratamientos experimentales fueron control (no monensina) y monensina a concentraciones de 4,8 (MB) y 24 (MA) mg/l. La concentración baja de monensina correspondió a la cantidad que recibían los terneros, asumiendo un volumen ruminal de 50 l para terneros de 350 kg de peso que ingerían diariamente 8 kg de pienso, y la concentración alta fue 5 veces mayor. Para la dosificación de la monensina se prepararon soluciones en etanol y se dosificaron 50 µl de la disolución correspondiente en cada botella. La dosificación se realizó inmediatamente antes del llenado de las botellas con 40 ml de una mezcla 1:4 (vol:vol) del medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970) y de fluido ruminal. La dosificación de la mezcla en las botellas se realizó en condiciones de anaerobiosis (gaseando continuamente con CO₂) y manteniendo una temperatura de 39°C. Tras el llenado, las botellas se cerraron herméticamente con un tapón de caucho y cápsulas de aluminio y se colocaron en un incubador a 39°C. Una vez transcurridas 17 horas de incubación (equivalente a un ritmo de paso de 0,06/h), se midió la cantidad de gas producido en cada botella y se tomó una muestra en un tubo de vacío para el análisis de la concentración en metano. A continuación, las botellas se abrieron, se midió el pH de su contenido y se tomaron muestras para analizar la concentración en ácidos grasos volátiles (AGV), amoníaco y lactato. Finalmente, el

* Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (PROFIT-FIT060000200511) y el CDTI (050617).

contenido de cada botella se filtró en crisoles previamente pesados para determinar la desaparición de MS del sustrato.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza que incluyó como efectos fijos el tipo de inóculo (adaptado a la monensina (**IN-A**) y sin adaptar (**IN-C**)), la dosis de monensina y la interacción inóculo x monensina. Las réplicas correspondientes al inóculo de cada animal se consideraron como un efecto aleatorio. Los análisis se llevaron a cabo con el PROC MIXED del programa SAS (versión 8.2, SAS Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos de los tratamientos sobre las variables determinadas se muestran en la Tabla 1. Los resultados se expresan como valores ponderados, considerando siempre un valor de 100 para el valor obtenido para cada inóculo cuando se incubó el sustrato en ausencia de monensina (tratamiento control).

Tabla 1. Efecto de la dosis de monensina (MB y MA) y del tipo de inóculo (**IN-C** y **IN-A**) sobre la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y metano, las concentraciones de amoníaco y lactato, las relaciones metano/AGV y acetato/propionato (Ac/Pr), el porcentaje de metano en el gas producido (%metano) y la desaparición de materia seca (DMS) tras la fermentación ruminal *in vitro* de un sustrato con un alto contenido en concentrado durante 17 horas (n=4)¹.

	MB		MA		e.e.d. ³	P = ²		
	IN-C	IN-A	IN-C	IN-A		IN	DM	INxDM
pH	99,9	99,7	100	100	0,31	0,932	0,452	0,517
Total AGV	95,3	100	91,8	91,7	2,21	0,562	0,009	0,175
Acetato	94,0	97,9	87,7	86,2	2,77	0,834	0,004	0,216
Propionato	113	115	114	120	4,7	0,550	0,391	0,546
Butirato	56,2	74,9	53,3	62,4	4,30	0,128	0,045	0,166
Otros AGV ⁴	81,1	98,3	75,4	82,4	6,09	0,310	0,046	0,281
Metano	75,7	89,8	61,6	73,0	5,05	0,049	0,005	0,728
Amoníaco	105	101	88,9	94,9	1,39	0,760	0,001	0,002
Lactato	111	148	116	145	5,7	0,213	0,850	0,385
Ac/Pr	83,3	85,0	76,9	71,9	2,61	0,614	0,002	0,125
Metano/AGV	79,4	90,1	66,8	80,3	6,12	0,115	0,041	0,759
% metano	78,3	94,1	67,0	79,2	5,91	0,036	0,020	0,673
DMS	94,5	96,7	82,4	95,1	3,93	0,072	0,050	0,109

¹ el inóculo control (**IN-C**) corresponde a terneros que no habían recibido previamente monensina en el pienso y el inóculo adaptado (**IN-A**) a terneros que habían consumido monensina (30 ppm) durante 4 meses. Los resultados se expresan de forma ponderada al valor obtenido para las incubaciones realizadas en ausencia de monensina con cada tipo de inóculo. MB: 4,8 mg monensina/l; MA: 24 mg monensina/l.

² IN: inóculo; DM: dosis de monensina; INxDM: interacción inóculo x monensina.

³ error estándar de la diferencia

⁴ calculados como la suma de isobutirato, isovalerato y valerato.

El contacto previo de los microorganismos ruminales con la monensina no afectó (valores de P entre 0,115 y 0,834) a la mayoría de las variables determinadas. Únicamente se observó que la reducción de la producción de metano y del contenido en metano del gas producido debida a la adición de monensina a los cultivos *in vitro* fue menor (P=0,049 y 0,036, respectivamente) para el **IN-A** que para el **IN-C**. Mientras que para el **IN-A** el

tratamiento con monensina ocasionó una disminución de la producción de metano hasta el 81,4% del valor obtenido para el control (valor medio para MB y MA), la reducción bajó hasta el 68,7% del valor del control para el **IN-C**. De forma similar, la proporción de metano en el gas producido correspondió al 86,7% de la observada en el control para el inóculo **IN-A**, y al 72,7% para el inóculo **IN-C**. Estos resultados podrían indicar que las arqueas metanogénicas del fluido ruminal de los terneros que recibieron monensina sufrieron un proceso de adaptación que redujo su sensibilidad a la monensina. De hecho, en trabajos previos se ha observado que la reducción de la producción de metano que se observa en rumiantes que reciben monensina en su dieta no se mantiene un tiempo prolongado, sino que al cabo de unas dos semanas de administración de la monensina la producción de metano recupera los niveles iniciales en terneros alimentados con dietas a base de grano o de forrajes (Johnson y Johnson, 1995; Sauer *et al.*, 1998). Asimismo, se observó una tendencia ($P=0,072$) a que la reducción de la DMS que ocasionó el tratamiento con monensina fuese menor para el **IN-A** que para el **IN-C**, si bien este efecto se observó únicamente para la dosis alta de monensina (reducciones hasta el 95,1 y 82,4% de los valores control para el **IN-A** y el **IN-C**, respectivamente).

El tratamiento con monensina provocó un aumento de la producción de propionato y una disminución de la producción de acetato y butirato y de la relación acetato:propionato. Busquet *et al.* (2005) y Castillejos *et al.* (2006) observaron efectos similares en fermentadores de flujo continuo que recibían diariamente una dosis de monensina equivalente a 12,5 y 10 mg/l, respectivamente. Los resultados de nuestro estudio revelan que dosis menores de monensina (4,8 mg/l) también pueden ocasionar estos efectos. Cuando se compararon ambas dosis de monensina, se observó que el aumento de la dosis de 4,8 a 24 mg/l acentuó la reducción de la producción de acetato ($P=0,009$), butirato (0,045) y metano ($P=0,005$), pero no afectó significativamente a la cantidad de propionato ($P=0,391$). Por otra parte, la interacción inóculo x dosis de monensina no fue significativa (valores de P entre 0,109 y 0,759) para ninguna de las variables estudiadas (con excepción de la concentración de amoníaco), lo que indicaría que la respuesta al tipo de inóculo no se vio afectada por la dosis de monensina en los cultivos *in vitro*.

Los resultados de este estudio indican que la utilización de fluido ruminal de terneros que habían recibido monensina durante un período de tiempo prolongado o de otros que no habían recibido este aditivo como inóculo para estudiar los efectos de la monensina sobre la fermentación ruminal *in vitro* no afectó significativamente a los resultados obtenidos, excepto a la producción a la metano. Estos resultados sugieren que las arqueas metanogénicas se habrían adaptado a la monensina, mientras que esta adaptación no se habría producido en otros microorganismos ruminales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P.W., Kamel, C. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flor continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88, 2508-2516.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., Tejido, M.L. 2005. Using the *in vitro* gas production technique to test feed additives: effects of correcting values for different blanks. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 173-184.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *Journal of Dairy Science*, 89, 2649-2658.
- Goering, M.K., Van Soest, P.J. 1970. *Agric. Handb. n 379. Agric. Res. Serv., USDA. Washington DC.*
- Johnson, K.A., Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483-2492.
- Sauer, F.D., Fellner, V., Kinsman, R., Kramer, J.K.G., Jackson, H.A., Lee, A.J., Chen, S. 1998. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *Journal of Animal Science*, 76, 906-914.