

## **EVOLUCION DE LAS POBLACIONES INTESTINALES DE ARQUEAS EN GANADO PORCINO DE CEBO: EFECTO DEL NIVEL DE PROTEÍNA Y FIBRA DE LA RACIÓN**

Seradj, A.R., Morazán, H.J., De la Fuente, G., Babot, D., Álvarez-Rodríguez, J. y Balcells, J.  
Departament Producció Animal, ETSEA, Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida  
balcells@prodan.udl.cat

### **INTRODUCCIÓN**

La contaminación medioambiental derivada de las explotaciones porcinas se sitúa en dos niveles: suelos y acuíferos (deyecciones) y atmosférica (emisión de gases: i.e CH<sub>4</sub>). El CH<sub>4</sub> es un gas inodoro con una elevada actividad radiativa y es considerado como uno de los principales gases que contribuyen al efecto invernadero (UNFCCC, 2005). El CH<sub>4</sub> procede de la fermentación anaerobia de carbohidratos estructurales, dicha fermentación generará una actividad reductora (H<sub>2</sub>) excedentaria que debe ser eliminada del intestino grueso mediante diversos procesos; en el rumen la síntesis de CH<sub>4</sub> por parte de las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas se ha citado como el mecanismo más importante de eliminación de H<sub>2</sub> (McAllister y Newbold, 2008) aunque en los fermentadores ceco-colónicos la contribución de las bacterias acetoclásticas, consumidoras de acético, a la síntesis de CH<sub>4</sub> es también relevante (Carter y Barr, 2013). El objetivo del presente trabajo es analizar la evolución de las arqueas metanogénicas a lo largo del intestino grueso (IG), su relación con la composición de la ración y la emisión diaria de CH<sub>4</sub> en estirpes comerciales de cerdos en cebo.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Un total de 64 híbridos Landrace x Large-White machos (Nucleos S.A.S, Le Rheu, Francia) fueron utilizados y distribuidos en cuatro módulos semi-emparrillados (16 animales/módulo) y estos a su vez en 4 corrales (4 animales/corral). El periodo experimental duró 35 días en los cuales los cerdos, alojados en los módulos estancos, recibieron sendas raciones experimentales formuladas en base a cereal y torta de soja (como fuentes de proteína) y pulpa de remolacha (como fuente de fibra neutro detergente (FND). La ración control (BPBF) se formuló a partir de los niveles convencionales de proteína bruta (PB) y FND (12,5 y 12%) y a partir de esta ración se incrementó un 5% el contenido de PB (AP), de FND (AF) o de ambas (APAF). Semanalmente, los animales se pesaron y se controló para cada corral la oferta y el rehusado. Finalizado el periodo experimental (108,7 kg de peso vivo) se seleccionaron 16 animales (1/corral: 4/tratamiento) y se sacrificaron para proceder inmediatamente al muestreo del ciego y colon. El ADN se extrajo de las muestras liofilizadas usando un kit comercial(QIAamp DNA Stool Mini kit, Qiagen Ltd., Reino Unido). El ADN extraído se amplificó mediante qPCR usando cebadores apropiados para cuantificar las bacterias totales (BT), arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH) y acetoclásticas (*Methanosarcina* spp. y *Methanosaeta* spp.), de acuerdo con el procedimiento descrito por Morazán et al (2015). La concentración de arqueas totales (AT) se calculó indirectamente a partir de los valores absolutos y relativos de AMH.

En los módulos estancos se controló el flujo de aire de entrada y la salida así como sus correspondientes concentraciones de CH<sub>4</sub>, determinando por diferencia los niveles de emisión individual. Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS V.9.4 (SAS Inst. Inc., Cary NC), procedimiento PROC MIXED. El modelo incluyó: tramo del intestino grueso (Ciego o Colon), nivel de proteína y fibra y sus interacciones como factores fijos y los animales como efectos aleatorios. Las diferencias entre las medias fueron evaluadas por el test de Tukey y los valores presentados corresponden a los mínimos cuadrados con sus correspondientes errores. La significación se declaró a un nivel de P<0,05.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las concentraciones absolutas de BT, AT y especialmente las AMH incrementaron con el tránsito del quilo a través del tracto ceco-colónico, siendo los valores registrados en colon superiores a los registrados en el ciego (P<0,05). Los incrementos registrados en las concentraciones de BT confirman los resultados previos obtenidos por Jensen y Jørgensen (1994). En relación al incremento registrado en la cuantificación absoluta de AMH, citar que dicho incremento podría estar justificado atendiendo a dos factores, por la mejora en las condiciones de fermentación para las arqueas (pH, anaerobiosis, presión osmótica), y por la

disponibilidad de sustrato, ya que la fermentación intestinal es un proceso complejo donde actuarán sincrónicamente distintas poblaciones, de las cuales las AMH ocupan las últimas posiciones y por tanto cabría esperar que incrementasen paulatinamente a lo largo del tránsito por el intestino grueso. La composición de ración modificó también las concentraciones de las poblaciones analizadas, aunque de forma desigual, así al incrementar el nivel de FND de la ración no se alteraron los títulos absolutos de las poblaciones analizadas aunque al aumentar el consumo/composición de PB incrementaron los títulos de BT. En el caso de las AMH, ambos factores (PB y FND) interaccionaron, así aquellos animales que recibieron la ración con la menor proporción de fibra (BF), los valores de BT incrementaron con el nivel de proteína, mientras que aquellos que recibieron (AF) se observó el efecto contrario. En ningún caso el efecto del nivel de PB y FND sobre los títulos de AMH tuvo su reflejo en los niveles de emisión de metano, no obstante sí se apreció una relación numérica ( $P>0,05$ ) en los títulos de arqueas totales (AT) y los niveles de emisión de  $CH_4$  que se presentan en las Figuras 1a y 1b.

Al expresar la evolución relativa de las AMH en relación al valor registrado de arqueas totales (AT;  $2^{ΔCt}$ ; Livak y Schmittegen, 2001); dicha relación, al igual que sucedía con los valores absolutos, incrementó a largo del tracto ceco-colónico y con el nivel de PB de la ración, no obstante al incrementar el nivel de FND las proporciones relativas de AMH se redujeron ( $P<0,05$ ).

La concentración relativa de *Methanosaeta* en el ciego fue superior a la registrada con AMH (Tabla 1) e incrementó de forma significativa durante el tránsito del quilo a través de colon ( $P<0,05$ ); dicho incremento fue relativamente mayor al registrado con las AMH aunque tampoco se apreciaron diferencias significativas relacionadas con el contenido de PB o FND de la ración sobre la concentración relativa de *Methanosaeta*.

En relación al género *Methanosarcina*, más versátil en relación a la utilización de diferentes sustratos (Cairó y París, 1988), su concentración en el quilo fue minoritaria y su relación con la emisión de  $CH_4$  imperceptible. Los resultados obtenidos confirman las diferencias en el perfil de poblaciones de arqueas entre fermentadores pre y postgástricos, con un predominio en estos últimos de las especies acetoclásticas (*Methanosaeta*), sin embargo la relación obtenida entre sustratos potencialmente fermentables, títulos de arqueas y emisión de  $CH_4$  son muy poco consistentes.

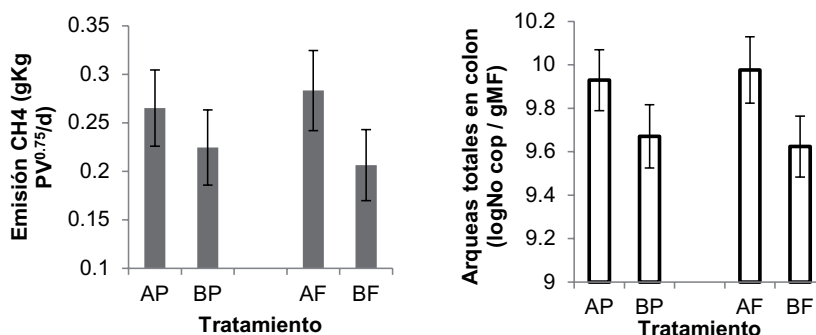
**Tabla 1.** Emisión de metano ( $CH_4$ ) y concentración ( $\log n^\circ$  cop /g de materia fresca (MF)) en quilo de bacterias totales (BT), arqueas totales (AT) y arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (AMH) así como las proporciones relativas ( $2^{ΔCt}$ ) de arqueas metanogénicas acetoclásticas (*Methanosaeta* y *Methanosarcina*) en cerdos en cebo alimentados con diferentes niveles de proteína y fibra<sup>1</sup>.

Ítem	Tramo <sup>2</sup> (IG)			PB		FND			P-valor		
	Ci	Co	SEM	AP	BP	AF	BF	SEM	IG	PB	FND
<b>Emisión (gKg PV<sup>0,75</sup>/d)</b>											
$CH_4$	-	-	-	0,27	0,22	0,28	0,21	0,031	-	0,47	0,17
<b>Cuantificación absoluta (<math>\log N^\circ</math> cop / g MF)</b>											
BT	11,6	11,9	0,08	11,9	11,6	11,8	11,7	0,08	0,01	0,03	0,3
AT <sup>3</sup>	9,5	9,8	0,11	9,6	9,7	9,7	9,6	0,12	0,03	0,42	0,31
AMH	5,9	7,7	0,14	7,2	6,4	6,7	7,0	0,15	<0,01	<0,01	0,18
<b>Cuantificación relativa (<math>2^{ΔCt}</math>)</b>											
AMH	0,1	1,7	0,31	1,5	0,3	0,3	1,5	1,34	<0,01	0,02	0,03
<i>Methanosaeta</i>	11,1	53,9	4,14	37,3	27,7	31,9	33,2	4,14	<0,01	0,11	0,83
<i>Methanosarcina</i>	2,5	0,7	1,01	1,8	1,4	1,6	1,5	1,1	0,16	0,79	0,94

<sup>1</sup> AP: alto en PB; BP: bajo en PB; AF: alto en FND; BF: bajo en FND.

<sup>2</sup> IG: intestino grueso; Ci: ciego; Co: colon.

<sup>3</sup> Cálculo estimado a partir de la cuantificación absoluta y relativa (AMHIAT) de AMH.



**Figura 1.** Emisión de metano (Figura 1a) y concentración de arqueas totales en colon (Figura 1b), en base a niveles altos (AP) o bajos (BP) de proteína o a niveles altos (AF) o bajos (BF) de fibra. Las barras indican la desviación estándar de las medias (N = 4).

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Cairó, J.J. & París, J.M. 1988. 4<sup>th</sup> Seminario de depuración anaerobia de aguas residuales. p 41-51. • Carter, E.A. & Barr, R.G. 2013. J. Nutri. Met. Article ID 540967. • Jensen, B.B. & Jørgensen, H. 1994. Appl. Environ. Microbiol. 60: 18971904. • Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Methods 25: 402-408. • McAllister, T.A. & Newbold, C.J. 2008. Aust. J. Exp. Agr. 48, 7-13. • Morazán et al., 2015. Environ. Prog. Sustain. Energy 34, 54-64. • Roca et al., 2014. BioMed Res. Int. DOI: 10.1155/2014/269402. • UNFCCC. 2005. Cuidar el clima: Guía de la convención marco sobre el cambio climático y el protocolo de kyoto. Secretaría de la Convención Marco sobre el Cambio Climático (CMCC), Bonn.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por el proyecto CICYT AGL 2010-20820. A. R. Seradj disfrutó de una beca AGAUR FI-DGR 2011.

### EVOLUTION OF ARCHAEOAL POPULATION IN THE INTESTINE OF GROWING-FINISHING PIGS: EFFECT OF PROTEIN AND FIBER LEVEL IN THE RATION

**ABSTRACT:** 64 Landrace x Large-White male hybrids were used and distributed in four semi-slatted (16 animals / module) modules and 4 pens (4 animals / pen) inside each module. The experimental period lasted for 35 days. In the sealed modules the input and output airflow as well as their corresponding concentrations of CH<sub>4</sub> was controlled. The Control (BPBF) ration was formulated based on conventional levels of crude protein (CP) and netro detergent fiber (NDF) (12.5 and 12%) from the control ration the CP and NDF content were increased by 5% in rations high in protein (AP), high in NDF (AF) or both (APAF). At the end of the experimental period 16 animals (1/corral: 4/treatment) were selected and sacrificed to perform the sampling of the cecum and colon to determine the abundances of certain types of microorganisms.

Throughout the large intestine abundances of total bacteria (TB) and methanogenic archaea increased. No significant effect of NDF in the ration was shown on the abundances of both TB and Hydrogenotrophic methanogenic archaea (HMA) where increase in CP significantly increased those aforementioned abundances. Despite of any significant differences in both enteric CH<sub>4</sub> emissions and the concentration of total archaeas (TA) in the colon but they increased with high levels of protein or fiber. These results suggest that the concentration of TA can be somehow related to enteric methane emissions level.

**Keywords:** growing-finishing pigs, methane production, methanogenic archaea.