

EFFECTO DE DISTINTOS TIPOS DE ADITIVOS SOBRE LA FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE CEBADA, EN CULTIVOS SEMICONTÍNUOS

Amanzougarene, Z., Yuste, S., de la Fuente, G¹., Vega, A. y Fondevila, M. Dept. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza-CITA. Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. ¹ Dept. de Ciència Animal, Universitat de Lleida, Av. A. Rovira Roura 191, 25198 Lleida; mfonde@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La transición de una dieta a base de leche y forraje a otra con altos niveles de concentrado es un momento crítico para la salud de los terneros en los sistemas de producción intensiva. La alta ingestión de concentrados formulados con elevadas proporciones de cereales y por tanto almidón rápidamente fermentable supone un alto riesgo de aparición de procesos de acidosis, debido a la alta producción de ácido láctico y ácidos grasos volátiles a partir de la fermentación microbiana, que promueve un descenso del pH hasta valores inferiores a 5,0 (Russell y Hino, 1985). Además, la capacidad tampón del líquido ruminal en esas condiciones es limitada, por la escasa secreción de saliva. Por tanto, la reducción de la magnitud o el ritmo de fermentación microbiana permitiría evitar el descenso de pH ruminal, contribuyendo a la prevención de la acidosis en terneros en transición. Con este fin, diversas sustancias, como taninos, ácidos grasos o aceites esenciales, pueden ser empleadas como aditivos en la alimentación de terneros para modular las condiciones ambientales y favorecer la adaptación del ambiente ruminal, siendo su efecto dependiente de sus características específicas. Para evitar un excesivo descenso del pH ruminal en dietas ricas en concentrado para el cebo de terneros, en este trabajo se estudia la posibilidad de reducir o ralentizar el ritmo de la fermentación microbiana con la inclusión de aditivos de diferentes características, en un sistema *in vitro* de cultivo semicontinuo.

MATERIAL Y MÉTODOS

La cinética de fermentación ruminal se determinó *in vitro* mediante un sistema de cultivo semicontinuo (Fondevila y Pérez-Espés, 2008). Se emplearon matraces Erlenmeyer de vidrio de 100 mL, en los que se incluyeron 800 mg de cebada, sin suplementar o con 20 mg/g de taninos de uva (GCT; Agrovin SA, extracto de hollejos y semillas), una mezcla de ácidos grasos de cadena media (de 6 a 12 átomos de carbono) incluidos a 4 mg/g (MFA; NUTRIKA Managing Animal Nutrition), 0,03 mL/g de ácido linoleico (LIN), y los aceites esenciales, eugenol (EUG, 0,12 mL/g) y cinamaldehído (CIN, 0,06 mL/g), provistos por NOREL Animal Nutrition. Los aditivos y sus dosis de inclusión fueron escogidos a partir de estudios previos. Se realizaron tres tandas de incubación de 24 horas, con matraces incluyendo 80 mL de medio de incubación, preparado con 20% de inóculo a partir de líquido de rumen procedente de tres terneros de cebo canulados. Se estableció una tasa de renovación de fase líquida de 0,08/h, mediante la sustitución en anaerobiosis de medio de incubación por solución fresca de incubación, sin inóculo, cada dos horas de 0 a 12 h, y cada 4 horas de 12 a 24 h. El tampón de la solución de incubación se ajustó para permitir el descenso del pH de incubación de 0 a 6 h, y su recuperación gradual hasta 6,5 de 8 a 24 h. La producción de gas como índice de fermentación se determinó inmediatamente antes del intercambio de volúmenes. El pH se midió a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, y 24 h. La concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) se determinó a las 8 y 24 h. Además, a las 8 h se obtuvieron muestras de fase líquida para estudios de biodiversidad microbiana, y a las 24 se estimó la desaparición de materia seca del sustrato sólido. La biodiversidad microbiana se determinó mediante Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP), cuyos resultados se analizaron a partir de una matriz generada para cada lista de datos obtenidos, y los resultados se presentan en forma de abundancia relativa. Las tres matrices resultantes de cada tanda y enzima fueron concatenadas y analizadas con el programa estadístico R. Se utilizaron los paquetes FactoMineR, Factoextra, MixOmics,

Vegan, MASS y Ggplot2 para llevar a cabo el análisis jerárquico de componentes principales para construir un dendrograma de análisis de clúster. Los resultados se analizaron estadísticamente por ANOVA, considerando la tanda de incubación como bloque y la botella como unidad experimental. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Valores de pH y producción de gas a las 4, 8, 12 y 24 h de incubación se presentan en la Tabla 1, como referencia del patrón de fermentación. Se consiguió un patrón de evolución de pH que simula las fluctuaciones diarias del pH ruminal *in vivo*; así, desde un valor inicial de $6,43 \pm 0,16$, el pH del medio mantuvo valores por debajo de 6,0 hasta las 8 h, subiendo gradualmente hasta 6,4 a las 24 h. No se observaron diferencias entre los distintos aditivos en a las 4 h ($P > 0,05$), pero a partir de las 8 h el pH fue mayor con GCT, mientras con CIN fue inferior al control a las 8 y 12 h ($P < 0,05$). En cuanto a la producción de gas, los aceites esenciales EUG y CIN promovieron volúmenes menores que CTR ($P < 0,05$) a lo largo del periodo de incubación, mientras que con GCT fueron menores a partir de las 8 h, y con LIN fue inferior al inicio de la incubación (4 h), pero no a las 8, 12 y 24 h. Por su parte, la producción de gas con MFA fue menor que con CTL a las 4 y 24 h. De forma similar, la desaparición de materia seca (dMS; Tabla 1) muestra que la inclusión de los diferentes aditivos redujo la dMS de la cebada ($P < 0,001$), con menores valores con GCT ($P < 0,05$). Estos resultados muestran las diferencias de respuesta en función del tipo de aditivo, promoviendo un pH más favorable con los taninos, y una menor magnitud de fermentación con los aceites esenciales.

Tabla 1. Valores de pH y volumen de gas producido (ml/g MO) a distintos tiempos de incubación *in vitro* de cebada sola (CTL) o suplementada con taninos (GCT), ácidos grasos de cadena media (MFA), ácido linoleico (LIN), eugenol (EUG) o cinamaldehído (CIN), y la desaparición de materia seca (dMS) después de 24 h.

	pH				Producción de gas (ml/g MO)				dMS
	4 h	8 h	12 h	24 h	4 h	8 h	12 h	24 h	
CTL	5.93	5.89 ^{bc}	6.19 ^b	6.37 ^b	45.1 ^a	77.0 ^a	108.0 ^a	172.0 ^a	0.404 ^a
GCT	6.01	6.07 ^a	6.31 ^a	6.46 ^a	41.2 ^{ab}	68.7 ^{bc}	95.3 ^b	144.5 ^c	0.299 ^c
MFA	5.94	5.95 ^{abc}	6.19 ^b	6.40 ^b	38.7 ^{bc}	69.9 ^{abc}	98.8 ^{ab}	155.7 ^{bc}	0.355 ^b
LIN	5.95	5.99 ^{ab}	6.25 ^{ab}	6.42 ^{ab}	40.1 ^b	71.0 ^{ab}	100.5 ^{ab}	160.7 ^{ab}	0.352 ^b
EUG	5.89	5.86 ^{bc}	6.18 ^b	6.41 ^{ab}	34.7 ^c	62.5 ^c	90.2 ^b	155.5 ^{bc}	0.350 ^b
CIN	6.01	5.81 ^c	6.04 ^c	6.37 ^b	24.8 ^d	48.0 ^d	75.4 ^c	149.5 ^{bc}	0.356 ^b
EEM	0.036	0.35	0.03	0.013	1.01	1.84	2.84	3.75	0.01

EEM: error estándar de medias. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas.

La concentración total de AGV (Tabla 2) fue mayor a las 8 que a las 24 h ($P < 0,05$), debido al efecto dilución del sistema de incubación. La proporción molar de butirato aumentó en el tiempo, a expensas de las de acético y propionato ($P < 0,05$). No se detectó un efecto de los distintos aditivos respecto al CTL en la concentración de AGV, aunque con MFA fue mayor que con EUG y CIN. No se observaron diferencias ($P > 0,05$) entre tratamientos en las proporciones de acetato y butirato, pero las proporciones del propionato fueron menores con la inclusión de EUG y CIN respecto a CTL ($P < 0,05$). De forma similar a lo observado en parámetros anteriores, los aceites esenciales (EUG y CIN) fueron los que más afectaron a la biodiversidad bacteriana a las 8 h de incubación, mientras con los otros aditivos se agruparon junto al control (Figura 1). En este sentido, Cardozo et al. (2006) concluyeron que estos dos aceites esenciales modifican el patrón de fermentación microbiana, especialmente el perfil de AGV, aunque en nuestro caso su efecto sobre la fermentación fue más acusado de lo esperado, llegando en el caso de CIN incluso a bajar el pH en relación a la cebada no suplementada. La inclusión de ácidos grasos de cadena media (MFA) y poliinsaturados (LIN) tuvieron un efecto poco apreciable, aunque teóricamente deprimen la actividad

microbiana, en especial los insaturados (Jenkins 1994). Por su parte, la inclusión de taninos de uva redujo la fermentación de la cebada, pero no modificó el perfil de AGV, y promovió un pH mayor que los restantes tratamientos.

Tabla 2. Concentración total y proporciones molares de ácidos grasos volátiles (AGV) a las 8 y 24 h de incubación de cebada sola (CTL) o suplementada con taninos (GCT), ácidos grasos de cadena media (MFA), ácido linoleico (LIN), eugenol (EUG) o cinamaldehído (CIN)

	AGV	Acetato	Propionato	Butirato
Tiempo				
8	24,1 ^a	0,465 ^a	0,182 ^a	0,117 ^b
24	16,7 ^b	0,391 ^b	0,145 ^b	0,183 ^a
EEM	0,508	0,0109	0,0051	0,0075
Sustrato				
CTR	21,3 ^{abc}	0,418	0,177 ^{ab}	0,143
GCT	21,2 ^{abc}	0,434	0,169 ^{ab}	0,141
MFA	22,1 ^a	0,426	0,180 ^{ab}	0,134
LIN	21,8 ^{ab}	0,415	0,187 ^a	0,138
EUG	18,1 ^{bc}	0,468	0,119 ^c	0,164
CIN	17,7 ^c	0,408	0,148 ^{bc}	0,178
EEM	0,879	0,0188	0,0088	0,0129
Probab.				
Tiempo	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Sustrato	0,0041	NS	<0,001	NS
T*Sust.	NS	NS	NS	<0,05

EEM: error estándar de medias. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. NS: $P > 0,05$.

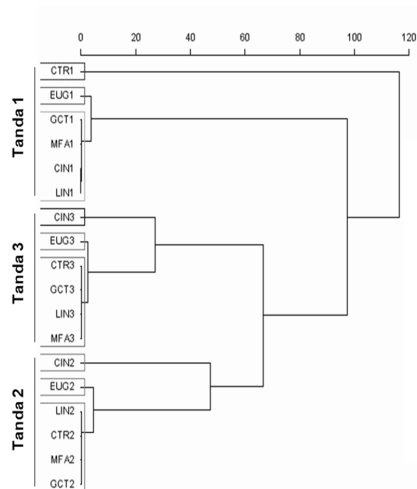


Figura 1. Dendrograma de diversidad bacteriana a las 8 h de incubación con cebada sola (CTL) o suplementada con taninos (GCT), ácidos grasos de cadena media (MFA), ácido linoleico (LIN), eugenol (EUG) o cinamaldehído (CIN). Escala de distancias euclidianas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cardozo, PW. et al. 2006. J. Anim. Sci. 84, 2801-2808
- Fondevila, M. & Pérez-Espés, B. 2008. Anim. Feed Sci. Technol. 144, 196-211
- Jenkins, TC. 1994. J. Nutr. 124, 1372-1376
- Russell, JB. & Hino T. 1985. J Dairy Sci 68,1712-1721.

Agradecimientos: Trabajo financiado con el Proyecto AGL 2013-46820 (MINECO).

EFFECT OF ADDITIVES FROM DIFFERENT NATURE ON BARLEY FERMENTATION IN *IN VITRO* SEMICONTINUOUS SYSTEM

ABSTRACT: Five additives (grape condensed tannins; GCT, mixture of mid-chain fatty acids; MFA, linoleic acid; LIN, eugenol; EUG, cinnamaldehyde; CIN) were studied to evaluate their effect on *in vitro* barley fermentation in intensive feeding beef diets, using a semicontinuous system and rumen inoculum from beef calves. The pH from 8 h onwards was highest ($P < 0.05$) with GCT, recording lower values with CIN at 8 and 12 h than CTR. The volume of gas produced with CIN was lowest ($P < 0.05$) from 4 h onwards. Between treatments, EUG and CIN recorded the lowest concentration of total volatile fatty acids and propionic proportion. Results were supported by those of bacterial diversity. Essential oils as additives, especially cinnamaldehyde, were those that reduced more ($P < 0.05$) barley fermentation, and negatively affected environmental conditions. In contrast, additives such as grape condensed tannins and fatty acids may reduce barley acidification potential.

Keywords: additives, pH, *in vitro* barley fermentation, intensive beef diets.