



Departament de Ciència Animal i dels Aliments
Universitat Autònoma de Barcelona

Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales



Lorena Castillejos Velázquez
Bellaterra, Abril 2005

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

Tesis Doctoral

MODIFICACIÓN DE LA FERMENTACIÓN MICROBIANA
RUMINAL MEDIANTE COMPUESTOS DE
ACEITES ESENCIALES

Lorena Castillejos Velázquez
Bellaterra, Abril 2005

**MODIFICACIÓN DE LA FERMENTACIÓN MICROBIANA RUMINAL
MEDIANTE COMPUESTOS DE ACEITES ESENCIALES**

**Tesis doctoral presentada por
Lorena Castillejos Velázquez**

**bajo la dirección del
Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort**

**Para acceder al grado de Doctor en el programa de Producción Animal de la
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS**

Bellaterra, Abril 2005

Sergio Calsamiglia Blancafort, Profesor Titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifico:

Que la memoria titulada “**Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales**” presentada por **Lorena Castillejos Velázquez** para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona, ha sido realizada bajo mi dirección, y considerándola concluida, autorizo su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y, para que así conste, firmo el presente en Bellaterra, 4 de Abril de 2005.

Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible la realización de este trabajo. Y muy especialmente:

A mi director. Gracias Sergi, por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por la dirección de este trabajo, por tu paciencia, tus consejos, y sobre todo, por ser un buen amigo.

A Alfred por su inestimable ayuda y amistad, así como a todos los profesores del departamento, al personal de la granja, y a Rosa y a Blas por vuestro apoyo y colaboración en este trabajo.

A Paul y Silvia por introducirme en la ciencia de los fermentadores, darme los consejos necesarios y animarme a iniciar este camino.

A los amigos y compañeros: a ti Bego por estar ahí y saber escuchar, a mis compañeras de despacho Ana Raquel y Begoña Anguita, a Ahmed, Moez, María, Gerardo, Cristóbal, Mario, Luciano, Aina, Vanesa, Juan, Marta, Vincent, y en especial al equipo de fermentadores, Paul, Silvia, Marta Busquet, Toni, Amine, Montse, Marta Blanch, Nacho, M^a Carmen y Martali, y a todos sus colaboradores. Y a los peques del grupo Lucia, Rita, Guillem y el que llega... por su alegría. Gracias por vuestra amistad, por todos los momentos compartidos dentro y fuera del departamento, y los que quedan por compartir...

A mis amigos de Santa Coloma por confiar en mi y aguantarme durante tantos años.

El agradecimiento más especial va dirigido a toda mi familia, a mis padres y a mi hermano por todo lo que soy, por creer en mi y hacerme sentir alguien especial. A ti Gonzalo, gracias por apoyarme, por estar siempre a mi lado y ayudarme en todo momento, y sobre todo, por todos estos años. Sin vosotros no hubiera podido, os quiero.

Y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma han puesto su granito de arena.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

Esta tesis doctoral se planteó debido a la necesidad de evaluar la capacidad de los aceites esenciales y de sus compuestos como aditivos ruminales. La aparición y la evolución de resistencias antibióticas hacia bacterias patógenas ha provocado la prohibición del uso de antibióticos en alimentación animal y ha estimulado la búsqueda de alternativas que posean actividad antimicrobiana. Los aceites esenciales y sus compuestos se presentan como una alternativa para mejorar la eficiencia de utilización de los alimentos y reducir las pérdidas de nutrientes modificando el perfil de fermentación ruminal.

En el primer estudio se utilizaron 8 fermentadores (1320 ml) de doble flujo continuo en dos períodos (8 d) para estudiar el efecto de una mezcla de compuestos de aceites esenciales (BEO, CRINA® RUMINANTS) sobre la fermentación microbiana y el flujo de nutrientes. Las condiciones de fermentación se mantuvieron constantes: temperatura a 39°C, pH a 6.4, y ritmo de paso de la fracción líquida a 10%/h y de la fracción sólida a 5%/h. Los tratamientos se distribuyeron en un diseño factorial 2 x 2, donde el tipo de ración (alta en concentrado: 90% concentrado y 10% paja; vs alta en forraje: 60% heno de alfalfa y 40% concentrado) y la adición de BEO (0 mg/l vs 1.5 mg/l) fueron los efectos principales. Las raciones (95 g/d de MS) se suministraron a cada fermentador en tres tomas diarias (0800, 1600 y 2400 h). Cada periodo experimental consistió en 5 d de adaptación y 3 d de muestreo. Las muestras se recogieron del efluente de los tres días de muestreo, y las bacterias se aislaron del contenido del fermentador el último día de cada periodo para su posterior análisis químico. Los efectos principales y sus interacciones se determinaron con un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del SAS. No se encontraron interacciones significativas entre el tipo de ración y la adición de BEO. Con la ración alta en concentrado se observó una mayor concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) totales (128.1 vs 110.9 mM), proporción de propionato (26.6 vs 20.5 mol/100mol) y proporción de butirato (18.5 vs 13.9 mol/100mol) en comparación con la ración alta en forraje. Con la ración alta en forraje se observó una mayor proporción de acetato (61.0 vs 50.3 mol/100mol), relación acetato:propionato (2.98 vs 1.98), concentración de N amoniacal (8.64 vs 3.01 mg/100ml), flujo total de N (3.57 vs 3.26 g/d), flujo de N amoniacal (0.27 vs 0.10 g/d), flujo de N no amoniacal (3.30 vs 3.17 g/d) y eficiencia de síntesis de proteína microbiana (EMPS; 29.8 vs 25.3 g N/kg MOVD) en

comparación con la ración alta en concentrado. La adición de BEO no afectó a la digestibilidad de MS, MO, FND, FAD y PB, pero incrementó la concentración de AGV totales (122.8 vs 116.2 mM) sin modificar significativamente las proporciones individuales de AGV o el metabolismo nitrogenado.

El segundo estudio consistió en varias pruebas experimentales diseñadas para estudiar el efecto de la dosis y del periodo de adaptación a la adición de BEO sobre el metabolismo nitrogenado de los microorganismos ruminales.. En la primera, se utilizaron de nuevo 8 fermentadores de doble flujo continuo (1320 ml) en dos periodos (6 d de adaptación y 3 de muestreo) para estudiar el efecto de la dosis de BEO sobre la fermentación microbiana ruminal. Los tratamientos fueron: CTR (sin adición de BEO), D5 (5 mg/l de BEO), D50 (50 mg/l de BEO) y D500 (500 mg/l de BEO), y se distribuyeron aleatoriamente en los fermentadores dentro de cada periodo. Los fermentadores se alimentaron con la ración alta en forraje del primer estudio, y el protocolo de funcionamiento y muestreo fue idéntico. Además, durante los tres días de muestreo, se recogieron muestras a las 0, 2, 4 y 6 h después de la alimentación de la mañana y se analizaron la concentración de N de péptidos grandes (GPep), péptidos pequeños más amino ácidos (PPep+AA) y N amoniacal, y el perfil de AGV a las 2 h. Los tratamientos no afectaron a la digestibilidad de MS, MO, FND, FAD y PB, ni al metabolismo nitrogenado. El tratamiento D5 incrementó la concentración de AGV totales, la proporción de acetato y la relación acetato:propionato, e inhibió la proporción de propionato y valerato en comparación con el tratamiento CTR. En la segunda prueba experimental se utilizaron 8 ovejas (peso medio de 57 kg) para estudiar el efecto de una adaptación larga del líquido ruminal a la adición de BEO sobre la fermentación ruminal. Los animales recibieron 1.3 kg de una dieta 50% forraje y 50% concentrado (15.7% PB; 38.4% FND). El tratamiento CTR (sin adición de BEO) se asignó al azar a 4 ovejas, y las otras 4 ovejas se adaptaron a BEO (110 mg/d de BEO) durante 4 semanas (ADBEO). Después de estas 4 semanas, se recogieron muestras de líquido ruminal a las 0 y a las 3 h después de la alimentación de la mañana durante dos días consecutivos usando una sonda esofágica, y se analizó la concentración de GPep, PPep+AA, N amoniacal, AGV totales e individuales, y el pH ruminal. El tratamiento ADBEO no tuvo efecto sobre el metabolismo nitrogenado y el pH. El líquido ruminal recogido de cada oveja CTR y ADBEO se utilizó para estudiar el perfil de fermentación *in vitro* de la harina de soja, harina de maíz, heno de alfalfa y heno de ryegrass. Los tratamientos

fueron: líquido control sin BEO (CTR), líquido CTR más una dosis única de BEO (11 mg/l; CTR+BEO) y el líquido ADBEO más una dosis única de BEO (11 mg/l; ADBEO+BEO). La proporción de acetato y la relación acetato:propionato aumentaron, y la proporción de propionato e isovalerato, y la concentración de AGV ramificados y N amoniacal disminuyeron en el líquido ADBEO+BEO comparado con el líquido CTR. Sin embargo, el tratamiento CTR+BEO no afectó a la concentración de N amoniacal ni al perfil de AGV comparado con el CTR. La adición de 5 mg BEO/l de líquido ruminal en cultivo continuo incrementó la concentración de AGV totales y la relación acetato:propionato después de 6 d de fermentación, pero los cambios sobre el metabolismo N sólo aparecieron en el líquido ruminal de ovejas alimentados con BEO durante 28 d.

En el tercer estudio se evaluaron los efectos de cinco compuestos de aceites esenciales sobre la fermentación microbiana ruminal. En la primera prueba experimental, los efectos de 4 dosis crecientes (5, 50, 500, y 5000 mg/l) de 5 compuestos de aceites esenciales se evaluaron en incubaciones *in vitro* de líquido ruminal durante 24 h con dos dietas diferentes: una dieta 60:40 forraje:concentrado (18% PB; 30% FND) y la otra 10:90 forraje:concentrado (16% PB; 25% FND). Los tratamientos fueron: control (CTR), eugenol (EUG), guaiacol, limoneno, timol (TIM), y vanillin. Después de 24 h se determinó el pH del líquido incubado y se recogieron muestras para analizar la concentración de N amoniacal y el perfil de AGV. La dosis 5000 mg/l de todos los compuestos en ambas dietas incrementó el pH final e inhibió la concentración total de AGV. El resto de resultados se presentan en función del tipo de dieta. En la dieta 60:40 forraje:concentrado; el EUG a 5 mg/l (E5) tendió ($P < 0.10$) a reducir la proporción de acetato y la relación acetato:propionato, a 500 mg/l (E500) redujo la proporción de propionato y la concentración de AGV ramificados, y a 50 mg/l (E50) y E500 tendió ($P < 0.10$) a reducir la concentración de N amoniacal, sin afectar a la concentración total de AGV. El guaiacol a 500 mg/l redujo la proporción de acetato y la concentración de N amoniacal, y la vanillin a 500 mg/l redujo la proporción de acetato. El guaiacol a 5 y 50 mg/l, el limoneno a 50 y 500 mg/l, y el TIM a 500 mg/l también disminuyeron la concentración total de AGV. En la dieta 10:90 forraje:concentrado; todas las dosis de guaiacol incrementaron la concentración de N amoniacal. El limoneno a 5 y 500 mg/l, y el TIM a 5 y 50 mg/l únicamente aumentaron el pH final. La vanillin a 5, 50 y 500 mg/l redujo la proporción de propionato e incrementó la relación acetato:propionato, y a 50

mg/l también incremento la concentración total de AGV y las concentraciones de N amoniacal y AGV ramificados. En la segunda prueba experimental se utilizaron 8 fermentadores de doble flujo continuo (1320 ml) en 3 periodos (6 d de adaptación y 3 d de muestreo) para estudiar el efecto del TIM y del EUG sobre la fermentación microbiana ruminal y el flujo de nutrientes. El funcionamiento de los fermentadores, el muestro y la pauta de alimentación fue idéntica al segundo estudio. Los tratamientos fueron: CTR (control negativo), MON (control positivo, 10 mg/l de monensina), T5 (5 mg/l de TIM), T50 (50 mg/l de TIM), T500 (500 mg/l de TIM), E5, E50 y E500, y se asignaron aleatoriamente a los fermentadores dentro de cada periodo. Los tratamientos MON y T500 redujeron la digestión de la MS, MO, FND y FAD respecto al tratamiento CTR. Los tratamientos T500 y E500 redujeron la concentración total de AGV; MON, T5, T500, y E500 modificaron el perfil de los AGV respecto al CTR. El tratamiento T5 tendió a reducir ($P < 0.10$) la proporción de acetato e incrementar la proporción de butirato, MON, T500 y E500 redujeron la proporción de acetato y la concentración de AGV ramificados y la relación acetato:propionato, e incrementaron la proporción de propionato. Además, T500 y E500 incrementaron la proporción de butirato y MON la redujo, y T500 redujo la proporción de valerato y E500 la incrementó. La concentración de N de GPep incrementó en T5, T500 y E500 en comparación al CTR. La concentración de N de PPep+AA disminuyó en T500. La concentración de N amoniacal tendió a incrementar ($P < 0.10$) en MON. La mayoría de estos compuestos de aceites esenciales a dosis elevadas demostraron poseer actividad antimicrobiana disminuyendo la concentración total de VFA. Sin embargo, EUG en incubaciones de 24 h y T5 en cultivo continuo modificaron el perfil de AGV sin inhibir la concentración total de AGV, y EUG disminuyó la concentración de N amoniacal. Una selección cuidadosa de estos compuestos permitiría la manipulación de la fermentación microbiana ruminal.

ABSTRACT

This doctoral thesis was planned to test the potential of essential oils and their compounds as ruminal additives. The appearance of antibiotic resistances towards pathogenic bacteria have led the prohibition for use of antibiotics in animal feeds and it has stimulated the search for alternatives that possess antimicrobial activity. Essential oils and their compounds appears as one of the most natural alternatives to antibiotics to improve the efficiency of use of feeds and reduce losses of nutrients by modifying ruminal fermentation profile.

In the first study, eight dual flow continuous culture fermenters (1320 ml) were used in two replicated periods (8 d each) to study the effects of a specific blend of essential oil compounds (BEO, CRINA® RUMINANTS) on rumen microbial fermentation and nutrient flow. Temperature (39°C), pH (6.4), and liquid (10%/h) and solid (5%/h) dilution rates were maintained constant. Treatments were arranged in a 2 x 2 factorial design. Main factors were type of diet (10 to 90 vs 60 to 40 forage to concentrate ratios) and the addition of BEO (0 vs 1.5 mg/l of BEO). Diets (95 g/d of dry matter) were fed in three equal portions along the day. Each experimental period consisted of 5 d for adaptation and 3 d for sampling. Effluent samples were taken from a composite of the three sampling days, and bacteria were isolated from fermenter flasks on the last day of each period for chemical analysis. There were no significant interactions between diet type and the addition of BEO. The high concentrate diet had a higher concentration of total volatile fatty acid (VFA; 128.1 vs 110.9 mM), proportion of propionate (26.6 vs 20.5 mol/100mol), and proportion of butyrate (18.5 vs 13.9 mol/100mol) compared with the high forage diet. The high forage diet had a higher proportion of acetate (61.0 vs 50.3 mol/100mol), acetate to propionate ratio (2.98 vs 1.98), ammonia N concentration (8.64 vs 3.01 mg/100ml), total N flow (3.57 vs 3.26 g/d), ammonia N flow (0.27 v. 0.10 g/d), non-ammonia N flow (3.30 vs 3.17 g/d) and efficiency of microbial protein synthesis (EMPS; 29.8 vs 25.3 g N/kg OMTD) compared with the high concentrate diet. There were no effects of BEO on DM, OM, NDF, ADF and CP digestion. The use of BEO increased the concentration of total VFA (122.8 vs 116.2 mM) without affecting individual VFA proportions or N metabolism.

The second experiment was designed to study the effect of dose of BEO and adaptation time to the addition of BEO on N metabolism of rumen microorganisms. The second study consisted in several tests. In the first, eight dual flow continuous culture fermenters (1320 ml) were used in two periods (6 d of adaptation and 3 d of sampling) to study the effects of increasing doses of a specific blend of essential oils (BEO, CRINA® RUMINANTS) on rumen microbial fermentation. Fermenters were fed with the same high forage ration of the first study and the sampling protocol and processing were identical. Treatments were: CTR (no BEO), D5 (5 mg/l of BEO), D50 (50 mg/l of BEO) and D500 (500 mg/l of BEO), and were randomly assigned to fermenters within periods. In addition, during the last 3 days, samples were taken at 0, 2, 4 and 6 h after the morning feeding and analyzed for large peptide (LPep), small peptides plus amino acid (SPep+AA) and ammonia N concentrations, and VFA profile at 2 h. There were no effects of treatments on DM, OM, NDF, ADF and CP digestion, and N metabolism. The D5 increased total VFA concentration, the proportion of acetate and the acetate to propionate ratio, and decreased the proportion of propionate and valerate compared with CTR. In the second experiment, eight sheep (average body weight of 57 kg) were used to study the effects of long term adaptation of rumen fluid to BEO on ruminal fermentation. Animals received 1.3 kg of a 50 to 50 forage to concentrate diet (15.7% CP; 38.4% NDF). Four sheep were assigned at random to the CTR treatment (no BEO) and four sheep were adapted to BEO (110 mg/d of BEO) for four weeks (ADBEO). After four weeks samples of ruminal fluid were obtained at 0 and 3 h after the morning feeding and in two consecutive days using an oro-ruminal probe. Samples were analyzed for LPep, SPep+AA and ammonia N concentrations, total and individual VFA, and pH. Treatment ADBEO had no effect on N metabolism and pH, but tended ($P < 0.10$) to increase the proportion of acetate and decrease the proportion of valerate compared with CTR. Ruminal fluid collected from each of CTR and ADBEO sheep was used to study *in vitro* fermentation profile of soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay. Treatments were: Control fluid without BEO (CTR), CTR fluid plus a single dose of BEO (11 mg/l; CTR+BEO) and ADBEO fluid plus a single dose of BEO (11 mg/l; ADBEO+BEO). The proportion of acetate and acetate to propionate ratio was higher, and the proportion of propionate and isovalerate, and BCVFA and ammonia N concentration were lower in ADBEO+BEO fluid compared with CTR fluid. However, treatment CTR+BEO had no effect on ammonia N concentration and VFA profile compared with CTR. The addition of 5 mg BEO/l of rumen fluid in continuous culture

increased total VFA concentration and acetate to propionate ratio after 6 d of fermentation, but changes in N metabolism were only apparent when using rumen fluid from sheep fed BEO for 28 d.

In the third study, several essential oil compounds were evaluated on rumen microbial fermentation. In the first experiment, the effects of 4 different doses (5, 50, 500, and 5000 mg/l) of five essential oil compounds were evaluated in *in vitro* 24 h batch culture of rumen fluid with two different diets: a 60 to 40 forage to concentrate diet (18% CP; 30% NDF) and a 10 to 90 forage to concentrate diet (16% CP; 25% NDF). Treatments were: control (CTR), eugenol (EUG), guaiacol, limonene, thymol (THY), and vanillin. After 24 h, the pH was determined in the culture fluid and samples were collected to analyze ammonia N concentration and VFA profile. The highest dose of all compounds increased the final pH and decreased total VFA concentration in both diets, and will not be discussed further. All other results are presented by type of diet. In the 60:40 forage to concentrate diet; EUG at 5 mg/l (E5) tended ($P < 0.10$) to reduce the proportion of acetate and the acetate to propionate ratio, at 500 mg/l (E500) reduced the proportion of propionate and branch-chained VFA (BCVFA) concentration, and at 50 mg/l (E50) and E500 tended ($P < 0.10$) to reduce ammonia N concentration, without affecting total VFA concentration. Guaiacol at 500 mg/l reduced the proportion of acetate and ammonia N concentration, and vanillin at 500 mg/l reduced the proportion of acetate. Guaiacol at 5 and 50 mg/l, limonene at 50 and 500 mg/l, and THY at 500 mg/l also decreased total VFA concentration. In the 10:90 forage to concentrate diet; all doses of guaiacol increased ammonia N concentration. Limonene at 5 and 500 mg/l, and THY at 5 and 50 mg/l only increased the final pH. Vanillin at 5, 50 and 500 mg/l reduced the proportion of propionate and increased the acetate to propionate ratio, and at 50 mg/l also increased total VFA, ammonia N and BCVFA concentrations. In the second experiment, eight dual flow continuous culture fermenters (1320 ml) were used in three periods (6 d of adaptation and 3 d of sampling) to study the effects of THY and EUG on rumen microbial fermentation and nutrient flow. Fermenters were fed with the same high forage ration of the second study and the protocol of sampling and processing were identical. Treatments were: CTR (negative control), MON (positive control, 10 mg/l of monensin), T5 (5 mg/l of THY), T50 (50 mg/l of THY), T500 (500 mg/l of THY), E5, E50 and E500, and were randomly assigned to fermenters within periods. Treatments MON and T500 reduced DM, OM, NDF and ADF digestion compared with CTR.

Treatments T500 and E500 reduced total VFA concentration, and MON, T5, T500 and E500 modified the VFA profile compared with CTR. T5 tended to reduce ($P < 0.10$) the proportion of acetate and increased the proportion of butyrate and MON, T500 and E500 reduced the proportion of acetate and BCVFA concentration and the acetate to propionate ratio, and increased the proportion of propionate. In addition, T500 and E500 increased the proportion of butyrate, and MON reduced it, and T500 reduced the proportion of valerate and E500 increased it. The concentration of LPep N was higher in T5, T500 and E500 compared with CTR. The concentration of SPep+AA N was higher in T500. The concentration of ammonia N tended to be higher in MON. Most of these essential oil compounds demonstrated their antimicrobial activity decreasing total VFA concentration at high doses. However, EUG in batch fermentation and T5 in continuous culture modified VFA profile without decreasing total VFA concentration, and EUG decreased ammonia N concentration. Careful selection of these essential oils compounds may allow manipulation of rumen microbial fermentation.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. Revisión Bibliográfica

A. Contaminación ambiental

1. Introducción.....	1
2. Contribución de la producción animal a la contaminación ambiental.....	2
3. Contribución del vacuno lechero.....	4
3.1. Pérdidas de fósforo.....	5
3.2. Pérdidas de potasio.....	6
3.3. Pérdidas de gases.....	6
3.4. Pérdidas de nitrógeno.....	7
3.4.1. Vías de excreción del exceso de nitrógeno.....	10
4. Legislación medioambiental.....	13
5. Alternativas para reducir la contaminación por nitrógeno.....	15
5.1. Manejo nutricional.....	15
5.2. Aditivos alimentarios.....	17
6. Implicaciones económicas.....	18

B. Manipulación de la fermentación ruminal

1. Introducción.....	19
2. Carbohidratos.....	19
2.1. Degradación de los carbohidratos en el rumen.....	19
2.2. Producción de AGV en el rumen.....	20
2.3. Poblaciones bacterianas en la producción de AGV.....	22
3. Proteína.....	23
3.1. Degradación de la proteína en el rumen.....	23
3.2. Población bacteriana con actividad proteolítica.....	25
3.3. Población bacteriana con actividad desaminasa.....	25
3.4. Implicación de las HAP en el metabolismo proteico.....	27
4. La manipulación de la fermentación ruminal mediante ionóforos.....	28
4.1. Mecanismo de acción de los ionóforos sobre las bacterias ruminales.....	29
4.2. Efecto de los ionóforos sobre el perfil de fermentación.....	30
4.3. Efecto de los ionóforos sobre la degradación proteica.....	31

C. La alternativa de los aceites esenciales

1. Introducción.....	33
----------------------	----

2. Extractos de plantas	33
3. Aceites esenciales	35
3.1. Composición de los aceites esenciales	36
3.2. Propiedades de los aceites esenciales	38
3.3. Aceite esencial de <i>Thymus</i> y <i>Origanum</i>	41
3.4. Susceptibilidad de las bacterias gram negativas y positivas	43
3.5. Mecanismo de acción de los compuestos activos de los aceites esenciales	44
3.6. Compuestos fenólicos.....	47
3.6.1. Timol, Carvacrol y Eugenol	48
3.6.2. Efectos del Timol sobre la microflora ruminal.....	49
3.7. Sinergismo y antagonismo entre los compuestos de aceites esenciales	51
3.8. Condiciones óptimas para desarrollar la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales y sus compuestos	51
3.9. Aspectos legales del uso de los aceites esenciales y sus compuestos	52
D. Conclusiones	54
E. Objetivos	55
F. Referencias Bibliográficas	56

CAPÍTULO 2

Effect of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system

Abstract	69
1. Introduction	70
2. Materials and methods	71
2.1. Diets.....	71
2.2. Specific blend of essential oil compounds	72
2.3. Continuous culture operating conditions.....	73
2.4. Sample collection and processing	73
2.5. Chemical analyses	74
2.6. Statistical Analyses.....	75
3. Results	76
3.1. Effects of diet	76
3.2. Effects of the BEO.....	78
4. Discussion	78

4.1. Effects of diet	78
4.2. Effects of the BEO.....	79
5. Conclusions	83
6. References	84

CAPÍTULO 3

Effect of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen nitrogen metabolism and fermentation profile in vitro and in vivo

Abstract	91
1. Introduction	92
2. Materials and methods.....	93
2.1. Experiment 1	93
2.1.1. Fermenters, Diet and Treatments	93
2.1.2. Sample Collection	94
2.1.3. Chemical Analyses	95
2.1.4. Statistical Analyses.....	96
2.2. Experiment 2	97
2.2.1. Animals, Diet and Treatments	97
2.2.2. Experimental Design and Sample Collection.....	98
2.2.3. Chemical Analyses	99
2.2.4. Statistical Analyses.....	99
3. Results.....	99
4. Discussion	106
5. Conclusions	111
6. References	112

CAPÍTULO 4

Effect of phenolic compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems

Abstract	117
1. Introduction	119
2. Materials and methods.....	120
2.1. Experiment 1	120
2.1.1. Diet and Treatments	120

2.1.2. Sample Collection and Chemical Analyses.....	121
2.1.3. Statistical Analyses.....	121
2.2. Experiment 2	122
2.2.1. Fermenters, Diet and Treatments	122
2.2.2. Sample Collection	123
2.2.3. Chemical Analyses	124
2.2.4. Statistical Analyses.....	125
3. Results and Discussion	125
4. Conclusions	139
5. References	141
CAPITULO 5. Discusión General.....	149
CAPITULO 6. Conclusiones General.....	155
CAPITULO 7. Anexo	159

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CAPÍTULO 1

Índice de tablas

Tabla 1. Valores típicos de DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno).....	3
Tabla 2. Producción de estiércol en España (1992)	3
Tabla 3. Tamaño de la explotación por volumen de cuota y producción (Tn)	4
Tabla 4. Ingestión, excreción y pérdidas anuales estimadas de N y NH ₃ por la producción animal en Holanda en 1986	9
Tabla 5. Excreción anual de N generado por la producción animal en España.....	9
Tabla 6. Producción animal mundial de nitrógeno (Tg N).....	10
Tabla 7. Flujo anual de N en una granja de vacuno lechero Frisona de 6250 Kg de producción media	12
Tabla 8. Bacterias ruminales, sus fuentes de energía y productos de fermentación <i>in vitro</i>	23
Tabla 9. Bacterias productoras de amoníaco aisladas del rumen	27
Tabla 10. Composición de tres aceites esenciales de orégano.....	37
Tabla 11. Actividad antimicrobiana (diámetro de inhibición, mm) de tres aceites esenciales de orégano y sus principales componentes	37
Tabla 12. Efecto antibacteriano de aceites esenciales y principios activos.....	39

Tabla 13. Compuestos mayoritarios de algunos aceites esenciales con propiedades antimicrobianas..... 42

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de las vías de excreción de nitrógeno 8

Figura 2. Esquema del metabolismo de nitrógeno en los rumiantes 11

Figura 3. Metabolismo de los carbohidratos 21

Figura 4. Esquema de las reacciones para la formación de los AGV..... 22

Figura 5. Esquema de la degradación proteica bacteriana 24

Figura 6. Estructura molecular de la monensina 29

Figura 7. Esquema del mecanismo de acción de la monensina sobre bacterias gram positivas ruminales 30

Figura 8. Estructura molecular de la fracción sarsaponina esteroideal 34

Figura 9. Esquema de las membranas celulares de las bacterias gram positivas y negativas 43

Figura 10. Localización y mecanismos de acción de los componentes de los aceites esenciales sobre la célula bacteriana 45

Figura 11. Esquema del mecanismo de acción sugerido para el carvacrol sobre la membrana citoplasmática 46

Figura 12. Compuestos fenólicos de aceites esenciales 48

CAPÍTULO 2

Índice de Tablas

Table 1. Ingredient and chemical composition of dietary treatments..... 72

Table 2. Effect the type of diet and the addition of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on true dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) digestion in continuous culture 75

Table 3. Effect the type of diet and the addition of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on total volatile fatty acid (VFA) concentration and profile in continuous culture 76

Table 4. Effect the type of diet and the addition of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on N metabolism of ruminal microorganisms in continuous culture 77

CAPÍTULO 3

Índice de Tablas

Table 1. Effect of dose of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) digestion in a dual flow continuous culture (Experiment 1).....	100
Table 2. Effect of dose of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on total volatile fatty acid (VFA) concentration and profile in a dual flow continuous culture (Experiment 1).....	100
Table 3. Effect of dose of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on N metabolism of ruminal microorganisms in a dual flow continuous culture (Experiment 1).....	101
Table 4. Effect of dose of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on N fraction concentrations (Experiment 1).....	102
Table 5. Effect of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on pH and total volatile fatty acid (VFA) concentration and profile of the rumen (Experiment 2a).....	103
Table 6. Effect of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on N fraction concentrations of the rumen (Experiment 2a).....	104
Table 7. Effect of four supplements on pH, ammonia N concentration and total and individual VFA concentration in in vitro fermentation (Experiment 2b).....	105
Table 8. Effect of long term adaptation to a specific blend of essential oil compounds (BEO) on pH, ammonia N concentration and total and individual VFA concentration in in vitro fermentation (Experiment 2b).....	106

CAPÍTULO 4

Índice de Tablas

Table 1. Effect of limonene on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets.....	130
Table 2. Effect of guaiacol on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets.....	131

Table 3. Effect of vanillin on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets	132
Table 4. Effect of thymol on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets	133
Table 5. Effect of eugenol on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets	134
Table 6. Effect of monensin, thymol and eugenol on dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) digestion in a dual flow continuous culture	136
Table 7. Effect of monensin, thymol and eugenol on total volatile fatty acid (VFA) concentration and profile in a dual flow continuous culture	137
Table 8. Effect of monensin, thymol and eugenol on N metabolism of ruminal microorganisms in a dual flow continuous culture.....	138
Table 9. Effect of monensin, thymol and eugenol on N fraction concentrations	139

CAPÍTULO 7

Índice de Tablas

Table 1. Effect of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on degradation of DM and CP of soybean meal (SBM), corn meal (CM), alfalfa hay (AH) and ryegrass hay (RH).....	163
Table 2. Effect of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on degradation of NDF and ADF alfalfa hay (AH) and ryegrass hay (RH).....	164

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. Contaminación ambiental

1. Introducción

La preocupación de la opinión pública por la calidad y el cuidado del medioambiente ha incrementado en los últimos años. Según la Agencia Europea de Medio Ambiente (1997) los sectores que constituyen fuentes importantes de contaminación en la UE15 son la industria, la energía, el transporte, el turismo y la agricultura. La agricultura contribuye de forma importante a los problemas del cambio climático, la lluvia ácida y la eutrofización. La problemática medioambiental causada por la actividad ganadera se inició con los cambios en los sistemas productivos, que intensificaron la producción incrementando el número de animales por hectárea. Se pasó de las explotaciones extensivas ligadas a la tierra a las explotaciones intensivas con poco o sin suelo disponible. Entre 1975 y 1995 más de 3 millones de explotaciones desaparecieron en la UE12. Entre 1980 y 1997 el número de explotaciones con ganado disminuyó un 47%, aunque el número de animales sólo disminuyó un 5%. En el caso del vacuno, el número de vacas lecheras disminuyó en un 20%, pero su producción permaneció estable. Por otra parte, el número de cerdos incrementó de 88 millones de cabezas en 1980 a 108 millones en 1997 (AEMA, 2001), y a 124 millones en diciembre de 1999 (MAPA, 2002). Estos cambios en los sistemas de producción han originado una concentración de la producción animal y, por lo tanto, una concentración de los agentes contaminantes.

En respuesta a la preocupación de la opinión pública, muchos países han tomado medidas legales para regular el manejo del estiércol y de sus nutrientes (Directiva 91/676/CEE). En Estados Unidos, las agencias reguladoras y los grupos medioambientales han centrado su atención sobre la ganadería, especialmente en el manejo del estiércol y su uso, ya que generan conflictos relacionados con los olores y la calidad del aire y del agua (Meyer, 2000).

Esta situación está forzando al sector de la producción animal a reevaluar los sistemas actuales de producción, alimentación, manejo y tratamiento de residuos. El vacuno lechero es uno de los sistemas productivos más estudiados por su aportación a la

contaminación ambiental como consecuencia de su ineficiencia en la utilización de nitrógeno. Las explotaciones de vacuno lechero contribuyen en un 60% al exceso de nitrógeno liberado al medio ambiente. El exceso de la excreción de este nitrógeno contribuye a la contaminación del aire por volatilización del amoníaco, y a la contaminación de los suelos y aguas en forma de nitratos.

2. Contribución de la producción animal a la contaminación ambiental

La agricultura origina un 97% de las emisiones de amoníaco (NH_3), un 45% de metano (CH_4) y un 48% de óxido nitroso (N_2O) (AEMA, 1997), contribuyendo en un 15% a los factores responsables del cambio climático, en un 50% a la lluvia ácida, y en un 85% a la contaminación de aguas subterráneas (Van Bruchem *et al.*, 1999).

Dentro de la agricultura, la ganadería contribuye de una forma importante a los problemas medioambientales. En Holanda, el vacuno lechero origina un 60% del exceso de N en áreas de cultivo, y las granjas de vacuno lechero y porcino contribuyen con un 35% y un 40% al exceso de P, respectivamente (Van Bruchem *et al.*, 1999).

La contaminación ambiental derivada de la producción animal está causada por un desequilibrio entre el aporte y las necesidades de nutrientes en el sistema. La intensificación de la producción ha hecho incrementar las necesidades, aumentando la intensidad del flujo de nutrientes a través de los animales. Este exceso de nutrientes supera la capacidad de la tierra para utilizarlos y reciclarlos causando la acumulación de C, N, P y K en el medio (Tamminga, 1996), contribuyendo a la contaminación del aire con amoníaco, metano, dióxido de carbono (CO_2), óxidos de nitrógeno (NO , NO_2 , N_2O) y otros gases que contribuyen al desarrollo del efecto invernadero, al desarrollo del agujero de la capa de ozono, y a la contaminación del agua y de los suelos con cantidades excesivas de N, P y K.

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es una medida cuantitativa de la contaminación del agua por materia orgánica. En la Tabla 1, Owen (1994) muestra el potencial contaminante del estiércol vacuno y porcino junto a otros agentes contaminantes con demandas bioquímicas de oxígeno elevadas. La DBO expresa el oxígeno requerido por la muestra para la descomposición de los desechos orgánicos, en

partes por millón (ppm) o mg de oxígeno por litro de muestra. El agua potable tiene una DBO de 0.75 a 1.5 ppm y se considera que el agua está contaminada si la DBO es mayor de 5 ppm.

Tabla 1. Valores típicos de DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno).

Causa	DBO (mg/l)
Aguas domésticas tratadas	20-60
Aguas domésticas sin tratar	300-400
Lavado de vegetales	500-3.000
Aguas sucias	1.000-2.000
Efluente filtrado de estiércol almacenado	1.000-12.000
Aguas de lodo	10.000-20.000
Estiércol de ganado vacuno	10.000-20.000
Estiércol de cerdo	20.000-30.000
Efluente de silo	30.000-80.000

Fuente: Owen (1994)

Aunque podemos observar que los purines del cerdo tienen un potencial contaminante muy elevado, en términos cuantitativos el ganado vacuno produce una mayor cantidad de estiércol, y por lo tanto posee un mayor potencial contaminante total. No hay que olvidar que el ganado bovino en España produce el 50.5% de las heces generadas por la actividad ganadera (Coll, 1995).

Tabla 2. Producción de estiércol en España (1992).

Especie y Tipo	Censo (Miles de cabezas)	Estiércol/cab/d (kg)	Total al día (Tn)
Porcino < 50 kg	8.576	3	25.728
Porcino engorde	7.400	6	44.400
Porcino reproducción	2.114	10	21.140
Bovino reproducción	2.765	55	152.075
Bovino 12-24 meses	527	30	15.810
Bovino 0-12 meses	1.500	5.8	8.700
Ovino reproducción	18.112	2.5	45.280
Ovino engorde	6.658	1	6.658
Equino	387	25	9.688
Avicultura puesta	38.323	0.2	7.646
Avicultura carne	68.028	0.1	6.802
Caprino reproducción	2.020	2.5	5.050
Caprino engorde	650	1	650
Total Kg estiércol/día	-	-	349.628

Fuente: Coll (1995)

El total de estiércol producido en España en 1992 fue de 127.614.240 Tn. La superficie agraria útil (SAU) era de 27.110.500 Ha. Teniendo en cuenta que podemos utilizar 25.000 kg de estiércol/Ha (175 kg de N según la legislación vigente), la capacidad de absorción de la SAU es de 677.762.500 Tn. Por lo tanto, todavía se dispone de un 81% de la capacidad (550.148.260 Tn/año), y la SAU puede absorber mucho más estiércol del producido. Ahora bien, la producción de estiércol debe producirse de forma controlada y procurando que tenga un destino, una utilización y una aplicación también controladas, para que así puedan pasar a ser considerados como subproductos ganaderos y no como fuente de contaminación (Coll, 1995).

3. Contribución del vacuno lechero

La productividad media por animal, el consumo de concentrado y el tamaño medio de los rebaños de vacuno lechero han aumentado en los últimos años contribuyendo al desarrollo de problemas de contaminación ambiental con sus productos de desecho (Lanyon, 1992). Entre 1975 y 1983, el número de vacas lecheras en la EU-9 permaneció estable en 25 millones de UGM (unidades ganaderas mayores). La introducción de las cuotas lechera en 1984 y el progreso técnico ocasionaron una reducción del 18% en el número de animales, entre 1983 y 1990. Desde 1990, el número de animales ha continuado disminuyendo un 2% anualmente. Este descenso se debe principalmente al incremento de la productividad por animal y al mantenimiento de las cuotas de producción (Eurostat, 2002). En la última década, el sector lácteo español ha perdido unas 100.000 explotaciones de vacuno lechero, y el resto han ido creciendo progresivamente tanto en número de animales como en producción por animal. Hace 10 años las granjas pequeñas producían el 74% de la producción total, y actualmente el 56% de la producción láctea española esta controlada por un 15% de explotaciones, todas ellas con más de 200.000 kg de cuota (Tabla 3).

Tabla 3. Tamaño de la explotación por volumen de cuota y producción (Tn).

Cuota (Kg)		92/93	01/02	02/03
< 200.000	Expl.	98%	86%	85%
	Tn	74%	47%	44%
200.000-300.000	Expl.	1%	7%	7%
	Tn	7%	14%	15%
> 300.000	Expl.	1%	7%	8%
	Tn	19%	39%	41%

Fuente: Pont (2002)

Entre los productos de desecho del vacuno lechero que son problemáticos para el medio ambiente, encontramos los desechos fecales y urinarios (con grandes cantidades de N, P y K) y los gases de fermentación y respiración (CO₂ y CH₄).

Desde un punto de vista medioambiental, el N y el P son los nutrientes que causan más problemas, y el NH₃, el CO₂ y el CH₄ son los gases más preocupantes (Tamminga, 1992; Van Horn *et al.*, 1994; Kuipers *et al.*, 1999). Aproximadamente, el 85% del N, el 67% P y el 86% del K que consume el ganado vacuno son excretados (Aarts *et al.*, 1992). Las pérdidas por kilogramo de leche varían de 10 a 45 g de N, de 0 a 3 g de P, y de 2 a 20 g de K (Tamminga, 1996). La escasa eficacia de retención de estos nutrientes en el producto final es un factor determinante para el desarrollo de los problemas medioambientales.

3.1. Pérdidas de fósforo

La eficiencia de utilización del P dietario es baja, ya que cerca de un 70% del P consumido se excreta (Aarts *et al.*, 1992). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el contenido de P del estiércol puede variar con la dieta. Morse *et al.* (1992) alimentaron a vacas Holstein con dietas que contenían 0.30, 0.41 ó 0.56 % de P, (equivalente a 60, 82 y 112 g de P/d, respectivamente), y observaron un aumento lineal en la excreción de P. Las pérdidas medias anuales de P₂O₅ en el estiércol de una vaca, una novilla y una ternera son de 41, 18 y 9 kg, respectivamente. Si comparamos esta producción con el porcino, un cerdo únicamente excreta 7.4 kg de P₂O₅/año (Kuipers *et al.*, 1999). Además, las raciones de vacuno lechero se formulan con un exceso de P con el objetivo de mejorar la eficiencia reproductiva. Muchos estudios han demostrado que una deficiencia de P dietario causa infertilidad o reduce los índices reproductivos del vacuno lechero (NRC, 2001). Sin embargo, no existen evidencias que apoyen que un exceso de P en la dieta por encima de las necesidades establecidas (NRC 2001; 0.40%) mejore la reproducción del vacuno lechero. Este argumento nos permite limitar el P dietario hasta aproximadamente un 0.40% de MS sin comprometer la producción lechera ni la reproducción, y minimizando la excreción de P en el estiércol y, por lo tanto, al medioambiente.

Con el objetivo de reducir la excreción de P en el estiércol, algunos países europeos están limitando la cantidad de estiércol por hectárea que se puede aplicar en base a la excreción de P. Un ejemplo es Holanda, donde se han asignado cuotas por granja de 125 kg de P_2O_5 /ha (Kuipers *et al.*, 1999).

3.2. Pérdidas de potasio

El potasio es altamente soluble en agua. Los valores máximos permitidos en el agua de bebida son de 12 mg/l, aunque estos límites y sus efectos no están bien documentados. En los últimos años, el aporte de K en los fertilizantes se ha reducido drásticamente, ayudando a que el exceso de K del suelo se estabilice en 80 kg por hectárea (Tamminga, 1996). A pesar de esto, el contenido medio de K en los forrajes ha ido incrementado debido a las nuevas técnicas de aplicación de estiércol. Con el objetivo de reducir las pérdidas amoniacales, la legislación ha impuesto modificaciones en las técnicas de aplicación de abono, como la inyección de estiércol en el cultivo, para evitar la volatilización del N, provocando como efecto secundario un incremento en la absorción de K por la planta.

3.3. Pérdidas de gases

El dióxido de carbono y el metano son los productos finales de la fermentación microbiana anaeróbica de la materia orgánica en el rumen.

El dióxido de carbono (CO_2) es uno de los gases responsables del efecto invernadero. El tráfico, por el uso de combustible, es el mayor responsable de la contaminación por CO_2 de la atmósfera. Si comparamos la producción anual media de CO_2 de un coche (5.500 kg) es muy parecida a la producción de CO_2 de una vaca adulta, que puede llegar a producir 4.000 kg al año (Tamminga, 1992). La contribución de la agricultura al efecto invernadero es casi del 10%, aunque tan sólo un 0.1% pertenece a las emisiones de CO_2 , y del resto son responsables el óxido nitroso (5.8%) y el metano (4.1%) (Eurostat, 2003).

La principal fuente de metano (CH_4) en la ganadería son las fermentaciones digestivas (un 22% de las emisiones totales del sector agrícola) y la digestión anaeróbica del

estiércol (un 7% del total de las emisiones; Mazzuchelli and Sánchez, 1999). Entre un 2 y un 12 % de la energía bruta ingerida por una vaca lechera se pierde como CH₄ (Tamminga, 1992). La modificación del perfil de fermentación hacia la producción de más propionato y menos acetato, reduciría la producción de CH₄. Mediante cambios en la composición de la ración o mediante la administración de promotores de crecimiento podemos reducir las pérdidas energéticas producidas por los gases de fermentación (CH₄ y CO₂).

El CH₄ es 15 veces más potente actuando en el efecto invernadero que el CO₂, y también contribuye al desarrollo del agujero de la capa de ozono. Los animales contribuyen un 15-25 % a la producción total de CH₄. El ganado vacuno es el responsable de un 74% del aporte total de los animales, y el 26% restante se atribuye al ovino (9%), el búfalo (6%), los rumiantes salvajes (3-8 %), y otros. La producción anual de una vaca adulta es de 110 kg de CH₄ (Tamminga, 1992; Tamminga y Verstegen, 1996).

3.4. Pérdidas de nitrógeno

El N del estiércol contribuye a la contaminación ambiental por dos vías: como amoníaco en el aire, y como N orgánico en el agua y el suelo (Tamminga, 1992; Van Horn *et al.* 1994).

En el estiércol encontramos dos formas de N: el N orgánico estable y el inestable. En los dos casos, este N orgánico se descompone a N inorgánico por microorganismos para poder ser utilizado por las plantas, obteniendo nitrato (NO₃) y amonio (NH₄). El N orgánico inestable está presente en la orina en forma de urea. La urea se descompone rápidamente a amonio (NH₄), que se transforma rápidamente a amoníaco (NH₃) cuando el pH aumenta y el estiércol empieza a secarse. El amoníaco es muy volátil y ocasiona la mayor parte de las pérdidas de N. El N orgánico estable se encuentra en las heces. La parte menos resistente de este N se descompone durante el año de aplicación, y el resto, la parte más resistente, se descompone lentamente durante varios años (Klausner, 1989).

El N urinario tiene un mayor impacto ambiental que el N fecal, ya que el 50% del N ingerido se pierde por orina y el 30% se excreta por heces. Únicamente una pequeña

parte del N fecal se excreta en forma de NH_3 , mientras que la mayor parte del N urinario se encuentra en forma de urea (Tamminga y Verstegen, 1996). Entre el 41 y el 49 % del N total excretado en el estiércol se encuentra en forma de urea y NH_3 (Van Horn *et al.*, 1994). El N excretado puede seguir tres ciclos: volatilización, nitrificación y desnitrificación (Figura 1).

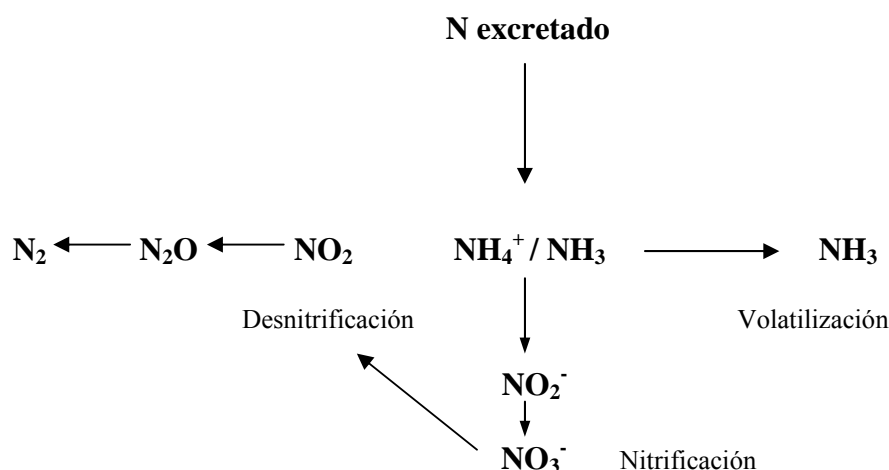


Figura 1. Esquema de las vías de excreción de nitrógeno.

Entre un 50 y un 75 % del N excretado se pierde en forma de NH_3 antes de que se convierta en nitrato (NO_3^-) mediante nitrificación (Van Horn *et al.*, 1994). Los nitratos se filtran fácilmente a aguas subterráneas, contaminándolas. El nitrato puede convertirse en N_2 gaseoso por desnitrificación y dejar escapar gases intermedios como el óxido de nitrógeno (NO), el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el óxido nitroso (N_2O) (Figura 1). Este último es uno de los mayores responsables del deterioro de la capa de ozono (Tamminga y Verstegen, 1996).

Las repercusiones del exceso de N en nuestros sistemas productivos y en el medioambiente son claras. La Tabla 4 muestra la contribución de la producción animal a las emisiones de N y NH_3 . El ganado vacuno, y en particular el vacuno lechero, excreta grandes cantidades de N debido a su aprovechamiento ineficiente. Únicamente se recupera en forma de leche o carne entre el 14 y el 25 % del N ingerido por el vacuno lechero (Korevaar, 1992; Aarts *et al.*, 1992). Las pérdidas por kilogramo de leche varían de 10 a 45 g de N (Tamminga, 1996).

Tabla 4. Ingestión, excreción y pérdidas anuales estimadas de N y NH₃ por la producción animal en Holanda en 1986.

Categoría	Input N (‘000 t)	Output N (‘000 t)	N Excretado (%)	Pérdidas de N y NH ₃ en el estiércol	
				Almacenado (‘000 t)	Campo (‘000 t)
Vacas lactantes	417	357	86	43.5	50.2
Novillas	125	117	94	14.2	16.4
Vacuno de carne	19	18	95	2.3	2.5
Terneras de carne	17	10	59	1.3	1.3
Ovejas	6	5	84	0.5	0.5
Engorde de cerdos	138	106	77	20.6	17.2
Cerdos pequeños	24	15	63	3.0	2.5
Cerdas jóvenes	8	7	88	1.2	1.0
Cerdas gestantes	37	31	84	4.7	5.2
Ponedoras	33	25	75	2.5	2.9
Broilers	76	53	70	4.8	6.3

Fuente: Adaptado de Tamminga y Verstegen (1996)

La Tabla 4 muestra una excreción media de los animales en producción del 80% del N ingerido. El vacuno lechero se encuentra por encima de la media con un 86%. Las pérdidas medias del porcino (78%) son inferiores a las del ganado vacuno. Además, cuando se considera el volumen total de N excretado, el vacuno lechero es el sector de la ganadería con mayor repercusión en la contaminación por N (Tabla 5).

Tabla 5. Excreción anual del N generado por la producción animal en España.

Categoría	N Excretado Kg/animal/año	Censo* (mil. cab.)	Excreción Total Tn/año
Bovino	100	6.291	629.100
Ovino y caprino	10	26.591	266.591
Porcino	11	22.418	246.598
Ponedoras	0.5	41.718	20.859

Fuente: Adaptado de Van der Hoek (1998)

*Censo de la ganadería Española del MAPA (2000)

La eficiencia de retención de N en producción animal se define como la ratio entre la producción y el input de N. En la Tabla 6 podemos observar que la media de la eficiencia de retención de N para todos los animales es ligeramente superior al 10%. Los cerdos y las aves tienen una eficiencia de utilización de N alta, con un 20% y un 34%, respectivamente, a diferencia del vacuno, donde encontramos una de las eficiencias de utilización de N más bajas. Aunque el búfalo y los pequeños rumiantes

tienen una eficiencia menor, la cantidad total de N excretado por el vacuno le da una mayor importancia a su baja eficiencia.

Tabla 6. Producción animal mundial de nitrógeno (Tg N = 10¹²g).

Animal	N ingerido	Producción (Carne, Leche, Huevos, Lana)	N excretado	Eficiencia de N
Vacuno	64.417	4.959	59.458	7.7%
Búfalos	7.102	0.370	6.731	5.2%
Camellos	1.046	-	1.046	-
Caballos	2.757	0.025	2.732	-
Ovejas	11.617	0.719	10.897	6.2%
Cabras	5.726	0.207	5.519	3.6%
Cerdos	12.230	2.513	9.717	20.5%
Pollos	9.495	3.211	6.284	33.8%
Total	114.355	12.004	102.384	10.5%

Fuente: Van der Hoek (1998)

El vacuno lechero debe mejorar su eficiencia de producción, produciendo la misma cantidad de leche con un número menor de animales y reduciendo la excreción de productos de desecho. Si la eficiencia del uso de nutrientes y la producción de leche se maximizan, las pérdidas de nutrientes al medio ambiente también se reducirán (NRC, 2001).

3.4.1. Vías de excreción del exceso de nitrógeno

El exceso de N en un animal rumiante puede perderse por diferentes vías en el metabolismo del N (Figura 2). Las pérdidas del N no retenido ocurren principalmente en el rumen, en el intestino, en vías metabólicas, por pérdidas endógenas y por pérdidas productivas (Tabla 7).

Las pérdidas ruminales de N son el resultado de la degradación microbiana ruminal de la proteína de la ración no compensada por la síntesis de proteína microbiana. Las pérdidas ruminales de N se deben a un exceso de N degradable en el rumen, a la falta de energía, o bien, a una menor eficiencia de captura del N degradable en el rumen por los microorganismos ruminales (Stern *et al.*, 1994).

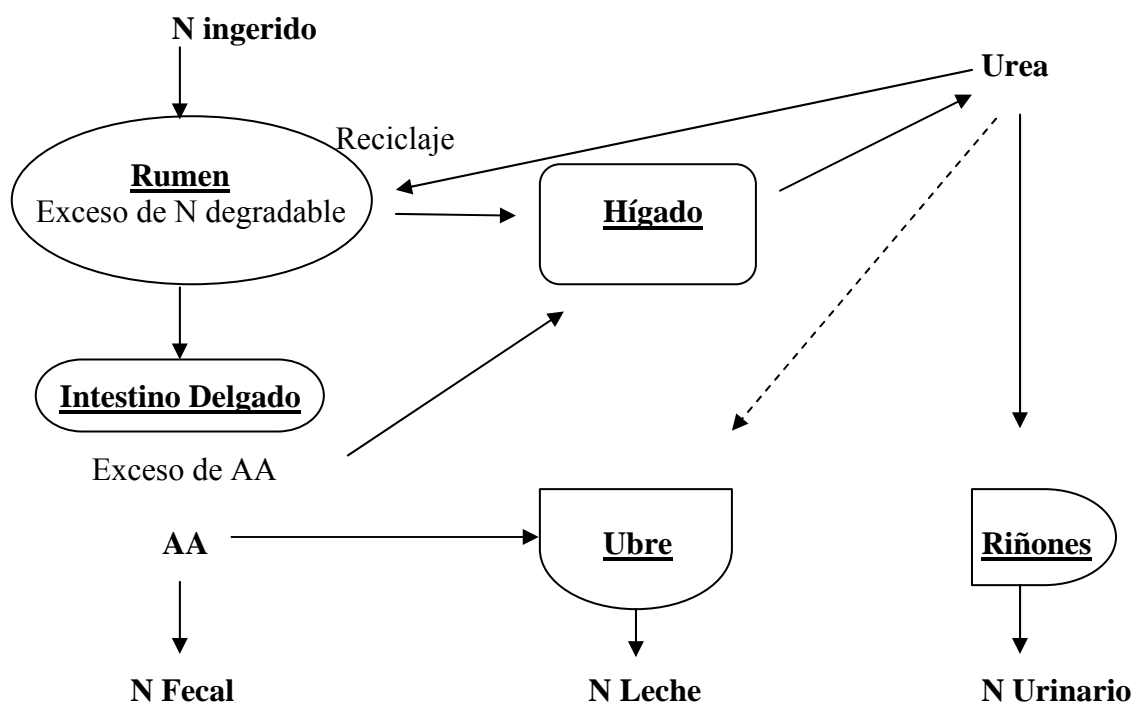


Figura 2. Esquema del metabolismo de nitrógeno en los rumiantes.

La degradación ruminal ocasiona anualmente entre 25 y 50 kg de pérdidas de N en una vaca lechera (Tamminga and Verstegen, 1996). Teniendo en cuenta que el vacuno lechero excreta entre 100 y 175 kg de N/vaca/año, es el rumen quien ocasiona el mayor porcentaje de pérdidas de N, entre un 15 y un 50 % de las pérdidas de N totales. El resto de pérdidas de N en el vacuno están ocasionadas por procesos endógenos, metabólicos o productivos que son difíciles de modificar. Tamminga (1992) concluyó que el rumen era el lugar que producía más pérdidas evitables de N en el vacuno. En la Tabla 7 se observa que el rumen es responsable del 14.3% de las pérdidas de N totales de todo el N ingerido, aunque si calculamos las pérdidas ruminales respecto al N excretado, el rumen es responsable de un 18%. Todas las pérdidas de N que se originan en el rumen escapan por orina y representan la mayor parte del N urinario. El N excretado por orina representa el 50% de las pérdidas totales del N ingerido (Tabla 7), aunque representan un porcentaje mayor del N excretado (63%). El alto porcentaje de pérdidas de N urinario que ocasiona el rumen y la posibilidad que ofrece de manipulación de la fermentación ruminal reduciendo la degradación proteica, lo sitúa como el lugar más adecuado para reducir estas pérdidas.

Tabla 7. Flujo anual de N en una granja de vacuno lechero Frison de 6250 Kg de producción media.

	Pérdidas de N		N utilizado	
	Heces	Orina	Leche	Tejido
	----- % -----			
Pérdidas ruminales	-	14.3	-	-
Indigestible	15	-	-	-
Endógeno	15	8.5	-	-
Ácidos nucleicos	-	8.5	-	-
Mantenimiento	-	3.4	-	0.5
Leche	-	13.6	18	-
Crecimiento	-	1.7	-	1.5
Total (175 Kg/año)	30	50	18	2

Fuente: Adaptado de Tamminga (1992)

En el intestino delgado, las pérdidas de N son consecuencia de la digestión incompleta del N alimentario y se excretan en forma de N fecal. Según Tamminga (1992) las pérdidas por indigestibilidad ocasionan el 15% de la excreción total del N y la mitad de la pérdida de N en heces (Tabla 7). En el rumiante, existe una variación importante en la digestibilidad intestinal de diferentes fuentes proteicas (50-98 %), e incluso entre diferentes muestras del mismo suplemento proteico (Calsamiglia y Stern, 1995). La manipulación de la digestibilidad intestinal para mejorar la utilización del N de la ración suele ir acompañada de un incremento en la degradación ruminal, y con ello de las pérdidas ruminales de N. Por el contrario, los tratamientos térmicos o químicos en exceso de la proteína para reducir la degradación ruminal pueden disminuir la digestión intestinal de la proteína (Stern *et al.*, 1994).

Una segunda forma de pérdidas de N en el intestino delgado son las secreciones endógenas de proteína en forma de enzimas digestivos, mucus y descamación de células epiteliales. Aunque la proteína endógena es responsable de un 15% de pérdidas de N, estas son inevitables, ya que la reabsorción de la proteína endógena digerida es incompleta (Tamminga y Verstegen, 1996).

Otro porcentaje importante de pérdidas de N (8.5%) que son difíciles de evitar o modificar, son las pérdidas metabólicas o de renovación de los tejidos (Tabla 7).

4. Legislación medioambiental

Desde que en 1967 se aprobó la primera Directiva de carácter ambiental, la protección y conservación del medio ambiente ha sido una de las principales inquietudes de la Comunidad Europea. El efecto medioambiental de la intensificación ganadera ha provocado que las nuevas Directivas europeas consideren a la ganadería intensiva como una actividad que debe ser regulada tanto por el impacto ambiental de las instalaciones ganaderas como por el correcto reciclado de los estiércoles. La legislación medioambiental que afecta a la producción del ganado vacuno puede agruparse en cinco grandes apartados:

1. Normativa del impacto ambiental de las explotaciones.

Las normativas de impacto ambiental que implican a la producción ganadera son:

- El Real Decreto-Ley 9/2000, que exige la declaración de impacto ambiental en explotaciones intensivas con más de 300 plazas en el caso de ganado vacuno lechero.
- La Directiva 96/61/UE relativa a la Prevención y Control Integrado de la Contaminación (IPPC), que regula los índices de emisión de 25 sustancias (nitratos, fosfatos, etc...) a la atmósfera, al agua y al suelo. La transposición de esta directiva al ordenamiento jurídico español, mediante la Ley 16/2002, obliga a evaluar los índices de emisión de nuestras explotaciones.

2. Normativa sobre los vertidos.

La normativa sobre vertidos se recoge en el Real Decreto 849/1986 de la Ley 29/1985 de Aguas y se refiere a los principales parámetros (pH, sólidos en suspensión, materias sedimentables, demanda química de oxígeno, demanda biológica de oxígeno y color) que se deben considerar en el tratamiento de los vertidos del sector ganadero.

3. Normativa sobre residuos.

La normativa sobre residuos en el ámbito europeo se recoge en la Directiva 91/156/CEE, transpuesta a la legislación española por la Ley 10/1998 de Residuos. En esta norma se contempla que únicamente serán considerados residuos los estiércoles ganaderos y otros residuos agrícolas peligrosos según la aplicación del

Real Decreto 261/1996 relativo a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrarias.

4. Normativa sobre la aplicación agrícola del estiércol.

La normativa que regula el aprovechamiento del estiércol ganadero se recoge en la Directiva 91/676/EU, transpuesta a la legislación española por el Real Decreto 261/1996 sobre nitratos, y el Decreto 220/2001 de gestión de las deyecciones ganaderas. Una de las restricciones más importantes establecidas por el Real Decreto 261/1996 es la limitación de la cantidad de estiércol aplicado anualmente según su cantidad de N, que no puede sobrepasar la cantidad de 170 kg/ha de N, permitiéndose hasta 210 kg/ha durante los cuatro primeros años posteriores a la entrada en vigor del decreto. También establece la necesidad de determinar las masas de agua que estén o podrían estar contaminadas con una concentración de nitratos superior a 50 mg/l (DARP, 2002; Sánchez, 1999; Martín, 2002).

5. Normativa sobre la protección del ambiente atmosférico.

La legislación que regula la contaminación del aire es, básicamente, la Ley 38/1972, de 22 de diciembre de Protección del Ambiente Atmosférico, y el Decreto 833/1975 que la desarrolla. Esta normativa regula las actividades potencialmente contaminantes de la atmósfera. Dentro del catálogo de actividades contaminantes se incluyen en el Grupo A los establos con más de 100 cabezas de ganado bovino y los estercoleros, compartiendo categoría con instalaciones como las refinerías de petróleo o la siderurgia integral (Sánchez, 1999).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) ha publicado su definición del término CAFO “explotaciones concentradas de alimentación animal” para proponer actividades permitidas y límites específicos sobre descargas contaminantes. La US EPA y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) han desarrollado un borrador de directrices nacionales que sugieren planes globales de manejo nutricional para las CAFO (Meyer, 2000; NRC, 2001).

La legislación ambiental pretende disminuir las emisiones de sustancias contaminantes por la producción ganadera. Las restricciones impuestas persiguen reducir el potencial contaminante de las aplicaciones de estiércol, limitando la cantidad aplicada por

hectárea según su cantidad de N. Es necesario reducir el porcentaje de N en el estiércol, y mejorar la eficiencia de utilización de este nutriente para disminuir su excreción en heces y orina.

5. Alternativas para reducir la contaminación por nitrógeno

Los sistemas productivos se han centrado en optimizar la producción (leche y carne) y mejorar su rentabilidad, sin tener en cuenta la emisión de productos potencialmente contaminantes en heces y orina (N y P) o en forma de gases (CH₄, CO₂, NH₃, etc...). La implantación de nuevas Directivas europeas para regular el impacto ambiental de las instalaciones ganaderas hace necesaria la aparición de nuevas estrategias productivas. La manipulación de la nutrición, el manejo del estiércol y/o el uso de aditivos pueden utilizarse como herramientas para controlar el impacto ambiental de la ganadería.

5.1. Manejo nutricional

Para aprovechar todo el potencial de las diferentes estrategias del manejo nutricional en el control de la contaminación ambiental, se han desarrollado diferentes modelos matemáticos que nos permiten predecir la cantidad y las vías de excreción de N en el vacuno lechero (AFRC, 1993; Van Horn *et al.*, 1994; Dou *et al.*, 1996; Jonker *et al.*, 1998; NRC, 2001).

El modelo de Kohn *et al.* (1997) demostró que existe un potencial real para reducir las pérdidas de N en las granjas de vacuno lechero mejorando el manejo nutricional del ganado. Este modelo permite evaluar el efecto o la importancia de diferentes estrategias de manejo (manejo nutricional de los animales, el manejo del estiércol o la selección del cultivo) sobre las pérdidas de N de todo el sistema productivo. El modelo estimó que el manejo nutricional era la estrategia más efectiva, reduciendo entre un 36 y un 40 % las pérdidas de N, a diferencia del manejo del estiércol que tan sólo las redujo en un 14%.

Es obvio que minimizar la ingestión de N es una de las estrategias más directas para reducir las pérdidas por heces y orina de este nutriente. Tamminga (1992) sugirió que el aporte de N dietario para vacuno lechero no debería exceder de 30 g/kg MS (18.75% PB) por razones medioambientales, y recomendó un mínimo de 24 g/kg MS (15% PB)

para permitir una fermentación ruminal óptima (Tamminga y Verstegen, 1996). Con estas estrategias podríamos mejorar la eficiencia de utilización actual del N, hasta conseguir que cerca del 30% del N ingerido por una vaca lactante se transforme en leche o ganancia de peso (Aarts *et al.*, 1992).

El rumen es el lugar más idóneo para conseguir minimizar estas pérdidas de N. La manipulación de la fermentación ruminal tiene un gran potencial para mejorar la eficiencia nutricional (Tamminga, 1992), ya que el resto de procesos metabólicos y productivos que ocasionan pérdidas de N son necesarios y difíciles de manipular. La manipulación del manejo nutricional a nivel ruminal debe centrarse en la reducción de la degradación ruminal de la proteína o la optimización de la utilización de N, resultando en la minimización de las pérdidas ruminales de N.

Por lo tanto, la manipulación de la dieta puede reducir la cantidad de N excretado y, particularmente, la forma en la que se excreta. Las pérdidas por heces y orina se pueden reducir minimizando la ingestión de N en relación a la energía, o sincronizando su disponibilidad en el rumen. Castillo *et al.* (2001b) observaron que la reducción de la degradabilidad ruminal de la proteína resultó en una reducción en la excreción total de N y de la proporción de N en orina. Además, incrementando la concentración energética de la ración utilizando fuentes de almidón de alta degradabilidad, también se puede reducir la cantidad de N total excretado y la proporción de N que se pierde en orina (Castillo *et al.*, 2001a; Kebreab *et al.*, 2002).

Otras estrategias nutricionales que pueden mejorar la eficiencia de utilización de los nutrientes, reduciendo su excreción, incluyen:

- incrementar el nivel de producción por vaca para reducir las pérdidas de nutrientes (N) por unidad de producto debidas al efecto de dilución del coste del mantenimiento del animal;
- minimizar las necesidades de proteína de la ración incrementando la ingestión de materia seca, sincronizando la degradación de carbohidratos y proteína en el rumen, estableciendo un balance correcto entre la proteína ingerida degradable y no degradable, y diseñando la ración con un perfil de aminoácidos equilibrado;

- mejorar las estrategias de agrupación para hacer lotes de animales más homogéneos en sus necesidades nutricionales para optimizar el racionamiento de nutrientes, reduciendo la sobrealimentación de algunos nutrientes, como el N (Hoover y Stokes, 1991; Tamminga, 1992; Chase, 1998; St-Pierre y Thraen, 1999; NRC, 2001).

5.2. Aditivos alimentarios

Cuando se agotan las alternativas del manejo nutricional de la ración, podemos recurrir a la utilización de aditivos alimentarios para mejorar la eficiencia de producción y reducir las pérdidas de nutrientes, estimulando o inhibiendo el metabolismo energético y/o nitrogenado.

Estos aditivos se han utilizado frecuentemente en vacuno como promotores del crecimiento, reduciendo la producción de metano y la excreción de nitrógeno. La prohibición del uso de estos aditivos (1 de enero del 2006, Reglamento 1831/2003/CE) puede resultar en un aumento en la incidencia de algunas patologías (acidosis, timpanismo, etc...), en los costes de producción y/o en la emisión de sustancias contaminantes al medio. Se ha estimado que la supresión del uso de estos promotores de crecimiento en la alimentación del ganado porcino, vacuno y avícola en Alemania, Francia y el Reino Unido, aumentará anualmente la emisión de N y P en 78.000 Tn. Asimismo, también aumentará la producción de CH₄ en 1.246.000 metros cúbicos cada día, únicamente en estos tres países (Carro y Ranilla, 2002). En España se ha estimado que la prohibición de los promotores de crecimiento aumentará entre un 3.5 y un 5 % los costes de producción.

La alternativa para estos antibióticos sería la implantación de nuevas estrategias de manejo y alimentación, o la utilización de aditivos alternativos que tengan efectos similares a los antibióticos promotores de crecimiento. Como sustancias alternativas destacan los probióticos y prebióticos, los ácidos orgánicos, las enzimas, y los extractos vegetales. Estos aditivos deben actuar sobre la degradación de la proteína y la utilización del N a nivel ruminal.

6. Implicaciones económicas

La implantación de una legislación que regule la aplicación y el manejo del estiércol combinado con una reducción de la aplicación de los fertilizantes inorgánicos puede reducir drásticamente las emisiones de nutrientes contaminantes (Berentsen *et al.*, 1992). Sin embargo, la introducción de medidas para reducir las pérdidas de N y P tendrán consecuencias económicas importantes en toda Europa. En Holanda, reducir un 40% el P dietario, un 27% las pérdidas de N y un 70% las pérdidas de NH₃ supone el incremento en el coste de producción equivalente a un tercio del total del valor añadido de la producción animal Holandesa (Tamminga y Verstegen, 1996). Aunque no hay estudios similares para el contexto de España, se puede considerar que las pérdidas serán de la misma magnitud.

B. Manipulación de la fermentación ruminal

1. Introducción

Los rumiantes dependen de los productos de la fermentación microbiana ruminal. Por ello, los nutricionistas buscan la manera de manipular la fermentación ruminal para modificar de forma positiva la cantidad y el perfil de los productos finales de la fermentación de los alimentos. La manipulación se puede llevar a cabo mediante cambios en la ración, el procesado de los alimentos y/o el uso de aditivos. Los aditivos deben maximizar la cantidad de nutrientes fermentados, optimizar el perfil de los ácidos grasos volátiles y la eficiencia de producción de la proteína microbiana, y/o minimizar la acumulación de amoníaco y la producción de metano y la acumulación de lactato. La consecución de estos objetivos requiere conocer el proceso de degradación de los carbohidratos y la proteína. Los carbohidratos son uno de los componentes más importante de las raciones para rumiantes a nivel cuantitativo, energético y funcional, y su manipulación debe conseguir optimizar la producción y el perfil de ácidos grasos volátiles minimizando las pérdidas energéticas en forma de metano. La degradación de la proteína es otro de los procesos ruminales que debe minimizarse mediante la manipulación de la fermentación ruminal, ya que es un proceso muy ineficiente que provoca grandes pérdidas económicas y problemas medioambiental debido a la excreción de amoníaco. Existen numerosos aditivos o antibióticos que han demostrado ser eficaces en el control de la degradación proteica mediante la inhibición del crecimiento de algunos microorganismos ruminales (Richarson *et al.*, 1976; Yang y Russell, 1993 a,b). El uso de estos productos requiere el conocimiento de los microorganismos y los mecanismos involucrados en el proceso de la degradación de la proteína.

2. Carbohidratos

2.1. Degradación de los carbohidratos en el rumen

Los carbohidratos son el componente cuantitativo más importante de la ración de un rumiante (70% de la ración), proporcionan el 70-80% de las necesidades energéticas del rumiante (Farey y Berger, 1988), y son los principales precursores de grasa y lactosa en

la leche de los rumiantes. Las raciones de rumiantes deben aportar los niveles necesarios de carbohidratos fibrosos y no fibrosos manteniendo un equilibrio entre ellos, para maximizar la ingestión de energía, optimizar la fermentación ruminal y evitar procesos patológicos.

Los microorganismos del rumen permiten a la vaca obtener energía de los carbohidratos fibrosos (celulosa y hemicelulosa) que fermentan lentamente en el rumen (Van Soest *et al.*, 1991). Además, la presencia de fibra es necesaria para estimular la rumia, las contracciones del rumen y la producción de saliva. Las raciones que no tienen suficiente fibra resultan en leche con porcentajes de grasa bajos y contribuyen a la aparición de desordenes digestivos como el desplazamiento de abomaso o la acidosis ruminal (Van Soest *et al.*, 1991). Estos carbohidratos fibrosos fermentan mayoritariamente a acetato y butirato por la acción de bacterias celulolíticas. Este proceso es energéticamente menos eficaz que la fermentación de los carbohidratos no fibrosos, ya que se pierde un carbono en forma de CH₄. Sin embargo, la producción de acetato y butirato es fundamental, ya que juegan un papel muy importante en la síntesis de grasa en la glándula mamaria (McDonald *et al.*, 1995).

Por el contrario, los carbohidratos no fibrosos (almidones, azúcares solubles y pectinas) fermentan rápida y casi completamente en el rumen (Van Soest *et al.*, 1991). Estos carbohidratos incrementan la densidad energética de la ración, aportando energía para el rumiante y para el crecimiento microbiano en el rumen. Sin embargo, los carbohidratos no fibrosos no estimulan la rumia ni la producción de saliva, favorecen la producción de ácido y la reducción de pH, y pueden inhibir la fermentación de la fibra si se encuentran en exceso en la ración. Los almidones y azúcares solubles fermentan a propionato sin pérdida de carbono, reduciendo las pérdidas energéticas en forma de CH₄. Por el contrario, las pectinas fermentan a acetato, reduciendo el riesgo de acidosis y estimulando la producción de grasa en leche en raciones con un porcentaje mayor de carbohidratos no fibrosos (Van Soest, 1991).

2.2. Producción de AGV en el rumen

Durante la fermentación ruminal, los microorganismos ruminales fermentan los carbohidratos mediante enzimas microbianas extracelulares hasta azúcares sencillos

(pentosas, hexosas) (Figura 3). Estos azúcares son absorbidos y metabolizados inmediatamente por los microorganismos hasta convertirlos en ácidos grasos volátiles (AGV), gases (CH_4 y CO_2), energía y calor. El ácido pirúvico es el intermediario común de la degradación de todos los carbohidratos en el rumen y de él parten las rutas metabólicas que conducen hasta cada uno de los AGV dependiendo de la población microbiana y/o ración (Leng, 1970). Los ácidos acético, propiónico y butírico son los AGV más importantes, ya que suman más del 95% de AGV producidos en el rumen. La fermentación de algunos aminoácidos (leucina, isoleucina y valina) en el rumen también produce otros ácidos grasos, los ramificados (isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato), importantes para el crecimiento de las bacterias celulolíticas (Dehority *et al.*, 1967).

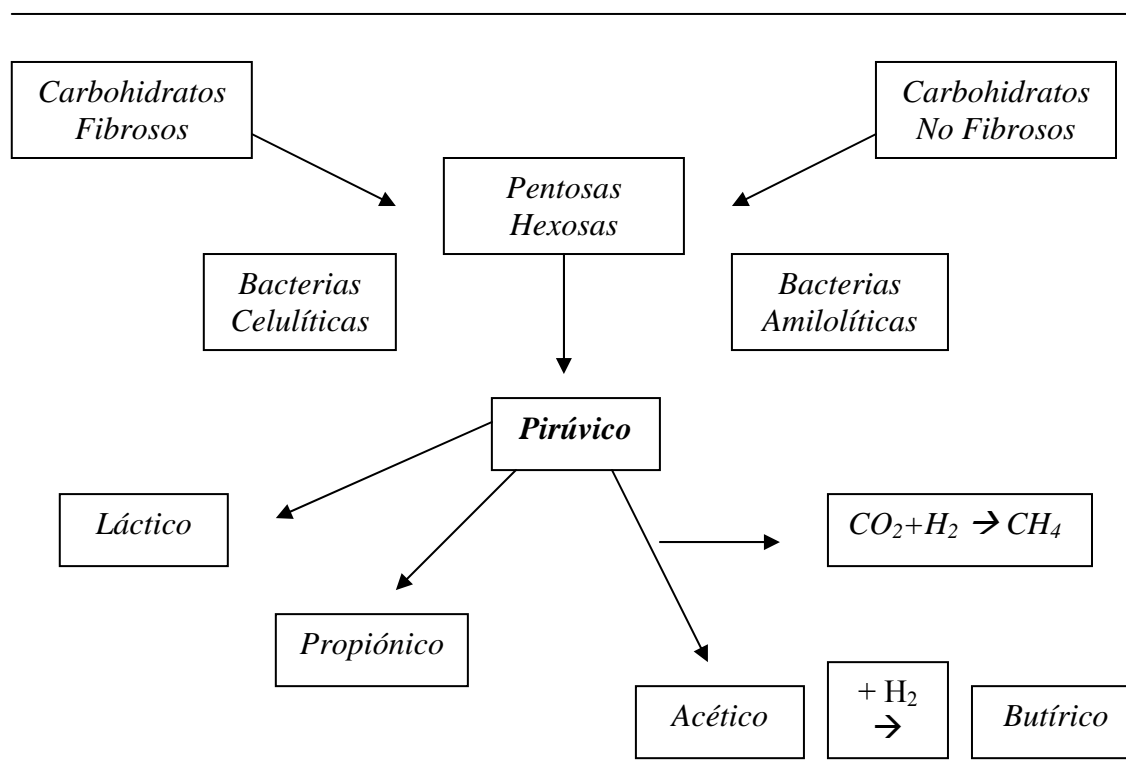


Figura 3. Metabolismo de los carbohidratos.

Tanto en la síntesis del acético como en la del butírico se forman los dos precursores (H_2 , CO_2) del CH_4 (Figura 4). El CO_2 y el CH_4 son eructados y la energía se pierde como subproducto necesario de la fermentación anaerobia de los azúcares. Además, durante el proceso de fermentación se produce energía (en forma de ATP) que se utilizará para el mantenimiento y crecimiento de la población microbiana.



Figura 4. Esquema de las reacciones para la formación de los AGV.

Los AGV son productos de desecho de la fermentación bacteriana ruminal, pero para el rumiante son la fuente más importante de energía. La mayoría son absorbidos a través de la pared del rumen (80-90 %) y el resto (10-20 %) serán absorbidos en el omaso y abomaso. La mayoría del acético y todo el propiónico son transportados al hígado. La mayor parte del propionato se metaboliza en el hígado, donde se oxidará o se utilizará como precursor de glucosa (Annison y Amstron, 1970). Durante la lactación, la glándula mamaria tiene una necesidad alta de glucosa, que se utiliza principalmente para la formación de lactosa (el azúcar de la leche). La producción de leche en las vacas esta muy condicionada por la cantidad de propionato producido en el rumen y metabolizado en el hígado a glucosa. La mayoría del acético escapa del proceso oxidativo y pasa a la circulación periférica, donde se utiliza como fuente de energía por muchos tejidos, y es el principal precursor de la lipogénesis. La mayoría del butirato (80%) se convierte en la pared del rumen en cetonas, principalmente β -hidroxibutirato (Farey y Berger, 1988). El β -hidroxibutirato se oxida en los músculos cardiacos y esqueléticos como fuente de energía, y se utiliza en la síntesis de ácidos grasos en el tejido adiposo y en la glándula mamaria. El acetato y β -hidroxibutirato son precursores de casi la mitad de la grasa de la leche que se sintetiza en la glándula mamaria, y la otra mitad proviene de los lípidos movilizados del tejido adiposo o directamente de la ración. Además, parte de la glucosa puede convertirse en glicerol y utilizarse para la síntesis de la grasa de la leche.

2.3. Poblaciones bacterianas implicadas en la producción de AGV

La cantidad y la proporción de AGV del rumen depende del tipo de población microbiana que fermente el alimento. Se han identificado más de 60 especies

bacterianas ruminales, la mayoría anaerobias estrictas, y que se encuentran en el orden de 10^9 - 10^{10} por ml de líquido ruminal. En la Tabla 8, McDonald *et al.* (1995) establece una relación de las especies más importantes aisladas *in vitro*, indicando el sustrato que utilizan y los productos de la fermentación. La población total de bacterias, así como la población relativa de cada especie particular, varía con la ración consumida por el animal.

Tabla 8. Bacterias ruminales, sus fuentes de energía y productos de fermentación *in vitro*.

Especies	Fuente de energía	Productos de fermentación					
		Acético	Propiónico	Butírico	Láctico	Succínico	Fórmico
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Celulosa, glucosa	+				+	+
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Celulosa, xilanos	+				+	+
<i>Ruminococcus albus</i>	Celobiosa, xilanos	+					+
<i>Streptococcus bovis</i>	Almidón, glucosa				+		
<i>Prevotella ruminicola</i>	Glucosa, xilanos, almidón	+				+	+
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Lactato, glucosa, glicerol	+	+	+			

Fuente: Adaptado de McDonald *et al.* (1995)

3. Proteína

3.1. Degradación de la proteína en el rumen

La degradación de la proteína de la ración en el rumen hasta péptidos, aminoácidos y amoníaco esta mediada por los microorganismo ruminales. La hidrólisis de la proteína es un proceso de pasos múltiples (Figura 5): solubilización, proteolisis, peptidolisis extracelular, transporte de péptidos y aminoácidos, peptidolisis intracelular, fermentación de los aminoácidos y formación de productos finales (NH_3 , AGV, CO_2 y CH_4). El primer paso es la solubilización de la proteína. La proteína solubilizada se adsorbe rápidamente a la membrana bacteriana, donde se lleva a cabo el ataque enzimático mediante proteasas de origen microbiano. A pesar de que los enzimas proteolíticos son extracelulares, la actividad proteolítica de la fracción líquida ruminal es baja (Buttery, 1988), ya que las proteasas y peptidasas ruminales están unidas principalmente a la membrana celular bacteriana. La hidrólisis que se produce en la

superficie de la célula permite que los microorganismos tengan acceso directo a los productos de la degradación proteica. Esta hidrólisis enzimática de los enlaces peptídicos libera péptidos y aminoácidos que serán absorbidos por la bacteria y usados como tales, incorporándose directamente a la proteína microbiana, o bien serán desaminados (Wallace y Cotta, 1988). La desaminación de los aminoácidos produce amoníaco y cadenas carbonadas como catabolitos finales. Los esqueletos de las cadenas carbonadas se utilizaran en la producción de AGV y CO₂, o bien serán utilizados, junto al amoníaco, en la síntesis de nuevos aminoácidos que serán incorporados a la proteína microbiana.

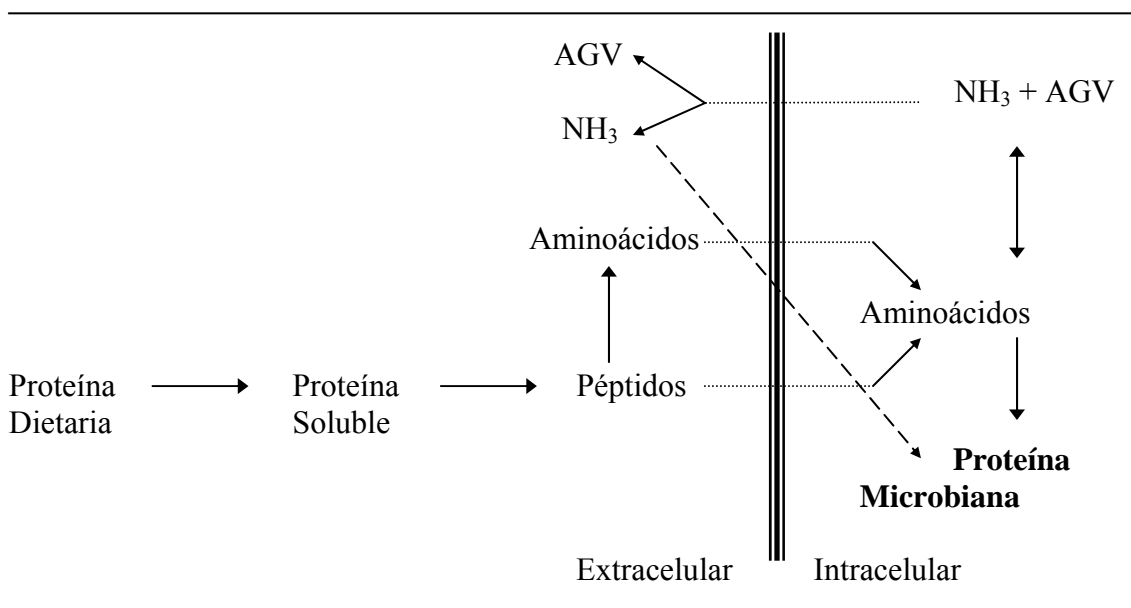


Figura 5. Esquema de la degradación proteica bacteriana.

Si la dieta tiene suficientes carbohidratos degradables, el amoníaco puede utilizarse como fuente de N para el crecimiento microbiano. Cuando el aporte de carbohidratos degradables en el rumen es bajo, gran parte de la proteína desaminada no podrá ser utilizada en la síntesis de proteína microbiana, ocasionando un excedente de amoníaco ruminal. Este amoníaco que no se aprovecha, se acumula en el líquido ruminal, pasa a sangre, llega a hígado y se convierte en urea. Parte de esta urea puede regresar al rumen a través de la saliva o, directamente, a través de la pared ruminal, pero la mayor parte se excreta en la orina y, por lo tanto, se pierde (McDonals, 1999). La pérdida de nitrógeno debido al exceso de amoníaco ruminal puede reducirse con la selección de proteínas resistentes a las proteasas y peptidasas ruminales. Estas pérdidas también pueden

reducirse mediante la inhibición de bacterias ruminales con elevada actividad proteolítica específica (Yang y Russell, 1993 a,b).

3.2. Población bacteriana con actividad proteolítica

La proporción de proteína degradada depende básicamente de su resistencia a la degradación y del tiempo que permanece en el rumen, aunque puede variar según la actividad proteolítica de la población microbiana.

La población microbiana ruminal tiene una amplia variedad de proteasas o enzimas proteolíticos. Los protozoos ciliados y algunos hongos anaeróbicos ruminales también participan en la actividad proteolítica, peptidolítica y de desaminación. Pero sin duda, las bacterias ruminales son el principal grupo microbiano implicado en el metabolismo proteico. Entre un 30 y un 50 % de las bacterias aisladas del líquido ruminal tienen actividad proteolítica (Wallace y Cotta, 1988). Las especies bacterianas más conocidas por su actividad proteolítica son: *Bacteroides amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides* o *Prevotella ruminicola* y *Streptococcus bovis*. Las especies que producen una cantidad importante de amoníaco por desaminación de aminoácidos son: *Bacteroides ruminicola*, *Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii* (Russell y Hespell, 1981; Wallace y Cotta, 1988).

En el rumen también existe una flora asociada a la pared ruminal con actividad proteolítica, diferente a la del contenido ruminal. Estas bacterias tienen un alta actividad específica, pero su número es bajo en comparación al contenido total del rumen, y su contribución a la proteolisis está limitada a la pared ruminal. Estas bacterias son las productoras más importantes de ureasa y juegan un papel fundamental en el reciclado de N a través de la pared ruminal (Wallace y Cotta, 1988).

3.3. Población bacteriana con actividad desaminasa

La identificación de la población microbiana responsable de la producción de amoníaco es el objetivo de muchas investigaciones. Durante muchos años se asumió que la desaminación se llevaba a cabo por algunas de las especies bacterianas más importantes numéricamente en el rumen (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Megasphaera elsdenii*,

Prevotella ruminicola, *Selenomonas ruminantium* y *Streptococcus bovis*) (Cotta y Russell, 1982). La producción de amoníaco de estas bacterias proteolíticas se comparó con el amoníaco producido por la mezcla total de bacterias ruminales, observando que las bacterias individuales no tenían suficiente capacidad desaminadora para explicar la producción de amoníaco que se obtenía *in vitro* con la mezcla total de la población bacteriana ruminal.

La mayoría de las bacterias proteolíticas aisladas del rumen producen amoníaco, aunque poseen una actividad específica de desaminación relativamente baja. Estas bacterias gram negativas son productoras de pequeñas cantidades de amoníaco a partir de proteína entera y proteína hidrolizada. Aunque pueden utilizar aminoácidos o péptidos como fuente de energía para su crecimiento, la mayor parte de la energía la obtienen de la fermentación de carbohidratos. Por el contrario, diversos estudios han demostrado la existencia de un grupo bacteriano numéricamente poco importante, aunque con una elevada actividad específica desaminadora, con la capacidad de crecer rápidamente en presencia de aminoácidos y péptidos, y que utilizan mal los carbohidratos (Chen y Russell, 1989a; Paster *et al.*, 1993). A este grupo de bacterias que utilizan péptidos y aminoácidos, y no carbohidratos, como principal fuente de energía, se les llamó bacterias hiperproductoras de amoníaco (HAP) (Chen y Russell, 1989a). Las especies bacterianas aisladas se identificaron como *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* y *Clostridium aminophilum* (Paster *et al.*, 1993). La sensibilidad natural de estos organismos frente a la monensina explica la reducción de la producción de amoníaco como consecuencia de la inhibición de la desaminación ruminal de este ionóforo (Chen y Russell, 1989b; 1990).

Por lo tanto, la desaminación de los aminoácidos en el rumen la llevan a cabo dos poblaciones bacterianas muy diferentes, una numéricamente importante pero con baja actividad, y otra, numéricamente poco importante pero con una gran actividad desaminasa (Tabla 9). La inhibición de este último grupo de bacterias dentro de la población microbiana ruminal puede tener un gran impacto sobre la producción de amoníaco y la eficiencia de retención de N en el vacuno.

Posteriormente se han aislado otras especies bacterias del grupo HAP. Attwood *et al.* (1998) aislaron 14 especies bacterianas de HAP del rumen de vaca, oveja y ciervo en

pastoreo. Las 14 bacterias fueron sensibles a la monensina y diferentes morfológicamente y genéticamente a las tres HAP originales. Estudios más recientes (McSweeney *et al.*, 1999; Eschenlauer *et al.*, 2002) han continuado aislando una gran diversidad de especies identificadas como HAP del rumen de cabras y ovejas canuladas, diferentes a las aisladas previamente.

Tabla 9. Bacterias productoras de amoníaco aisladas del rumen.

Grupos bacterianos	
<u>Baja actividad desaminadora</u> <u>Alto porcentaje numérico</u>	<u>Elevada actividad desaminadora</u> <u>Bajo porcentaje numérico</u>
<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ✓ <i>Megasphaera elsdenii</i> ✓ <i>Prevotella ruminicola</i> ✓ <i>Selenomonas ruminantium</i> ✓ <i>Streptococcus bovis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Clostridium aminophilum</i> ✓ <i>Clostridium sticklandii</i> ✓ <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<p>> 10⁹ por ml 10-20 nmol NH₃ min.⁻¹ (mg proteína)⁻¹ Normalmente resistentes a la monensina</p>	<p>10⁷ por ml 300 nmol NH₃ min.⁻¹ (mg proteína)⁻¹ Sensibles a la monensina</p>

Fuente: Wallace (1996)

3.4. Implicación de las HAP en el metabolismo proteico

La dependencia de las bacterias HAP de péptidos y aminoácidos para su crecimiento, y su incapacidad de fermentar carbohidratos, las coloca en el nicho ruminal de fermentación obligada de péptidos y aminoácidos. Además, la incapacidad de usar proteína intacta como la caseína como fuente de nitrógeno sugiere la falta de proteasas extracelulares (Attwood *et al.*, 1998). Parece ser que las bacterias HAP dependen de organismos proteolíticos para llevar a cabo la primera hidrólisis de proteína y grandes péptidos, y usar los pequeños péptidos y aminoácidos liberados como sustratos para la fermentación.

El aislamiento de las bacterias HAP del rumen ha ocasionado un gran interés por conocer su prevalencia dentro de los rumiantes y su contribución a la degradación proteica ruminal. Attwood *et al.* (1998) indicaron que en el rumen de vacas, ciervos y ovejas existe un 5.2, 1.3 y 11.6 % de bacterias HAP del total de bacterias ruminales, respectivamente. Recientemente, Rychlik y Russell (2000) desarrollaron un modelo matemático para estimar la producción de amoníaco de las diferentes clases de bacterias

ruminales productoras de amoníaco. La diversidad numérica y morfológica de estas bacterias ruminales especializadas sugiere que probablemente son responsables de una proporción importante de la desaminación de aminoácidos.

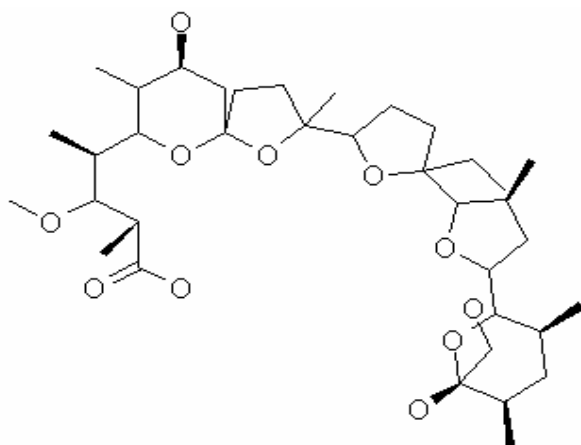
Existe una gran variabilidad de datos de producción de amoníaco en el líquido ruminal. Gran parte de esta variabilidad se explica por la relación entre la ración y la población bacteriana, en general, y la población de bacterias HAP, en particular. Rychlik y Russell (2000) observaron que la población bacteriana total de vacas alimentadas con una ración basada en forraje produjo dos veces más rápido amoníaco que la mezcla de bacterias ruminales de vacas alimentadas con una ración basada en concentrado. El modelo matemático indicó que los animales alimentados con forraje tenían cuatro veces más HAP que los alimentados con concentrado.

4. La manipulación de la fermentación ruminal mediante ionóforos

La manipulación de la población microbiana ruminal puede utilizarse para inhibir o modular la actividad de especies microbianas que intervienen en el metabolismo energético y proteico. La actividad de ciertos microorganismos ruminales puede controlarse mediante el uso de aditivos o antibióticos alimentarios.

Los ionóforos son productos del metabolismo de varios actinomyces (normalmente *Streptomyces spp.*). Son sustancias altamente lipofílicas y tóxicas para muchas bacterias, protozoos, hongos y otros organismos. A mitad de los setenta, los ionóforos fueron aprobados por la Administración de Alimentos y Drogas de EEUU para su adición en dietas de rumiantes (Russell y Strobel, 1989). Desde entonces, se han utilizado extensivamente en vacuno de carne como promotores de crecimiento, mejorando la eficiencia de producción mediante la modificación del metabolismo energético y nitrogenado, y la reducción de la incidencia de acidosis y meteorismo.

La monensina, el producto derivado del metabolismo de *Streptomyces cinnamonensis*, ha sido el ionóforo más utilizado en producción animal. Este antibiótico pertenece a los antibióticos poliéter ionóforos carboxílicos (Figura 6). Los cambios nutricionales que promueve son un incremento en el porcentaje de propionato en el rumen, y el control de la producción de amoníaco debido a la inhibición del metabolismo peptídico y la



supresión del crecimiento de las bacterias con alta actividad desaminadora (Wallace, 1996). Este efecto se canaliza a través de la inhibición del crecimiento de las bacterias ruminales gram positivas (Russell, 1987), teniendo un efecto menor sobre las bacterias gram negativas (Attwood *et al.*, 1998).

Figura 6. Estructura molecular de la monensina.

4.1. Mecanismo de acción de los ionóforos sobre las bacterias ruminales

Los ionóforos metálicos alcalinos modifican la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, formando complejos con el sodio en la membrana celular y permitiendo el transporte pasivo de iones (Russell, 1987; Russell y Strobel, 1989). El sodio (Na^+) es el cation extracelular que predomina en el rumen y el potasio (K^+) es el cation intracelular que predomina en la bacteria ruminal. Cuando la monensina se liga a la membrana celular, la primera reacción que ocurre es el movimiento de K^+ fuera de la célula bacteriana. Como consecuencia, los protones (H^+) entran en la célula debido al gran gradiente de K^+ a través de la membrana. La acumulación de H^+ dentro de la célula provoca un descenso del pH intracelular. La célula responde a este descenso con una exportación activa de H^+ fuera de la célula, compensada por la entrada Na^+ . La pérdida de energía requerida por la bomba de ATP para mantener el pH intracelular y el balance de iones, reduce el crecimiento y la reproducción de la bacteria, que acaba muriendo (Figura 7).

Sin embargo, la membrana externa de las bacterias gram negativas, formada por proteínas, lipopolisacáridos y lipoproteínas, les confiere protección frente a moléculas grandes como los ionóforos. Estas bacterias resistentes a la acción de los ionóforos, producen normalmente propionato y succinato como productos finales de fermentación. Por el contrario, las bacterias gram positivas, que no tienen una membrana externa y por tanto son más sensibles a los ionóforos, producen acetato, butirato, hidrógeno, amoníaco

y ácido láctico. La selectividad de estos antibióticos frente a grupos bacterianos específicos modifica el perfil de fermentación ruminal.

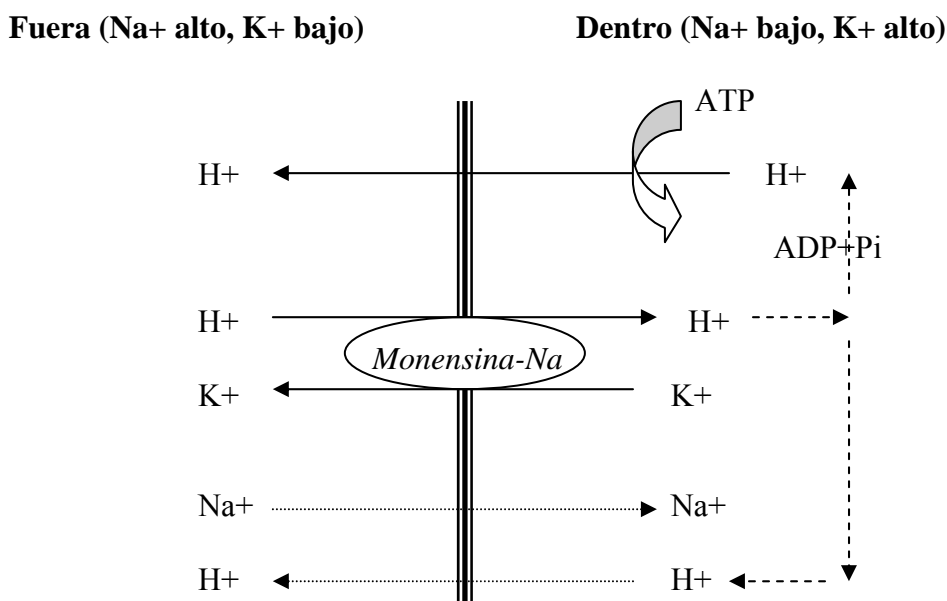


Figura 7. Esquema del mecanismo de acción de la monensina sobre bacterias gram positivas ruminales. Fuente: Russell (1987)

4.2. Efecto de los ionóforos sobre el perfil de fermentación

Los rumiantes utilizan los AGV y la proteína microbiana resultantes de las fermentaciones ruminales como nutrientes mayoritarios, pero el CH₄ se pierde en forma de gas durante la erucción. La producción de CH₄ es de más de 12 l/h, puede variar con el tipo de ración, y normalmente representa entre un 2 y un 12% de pérdidas energéticas para el animal (Russell y Strobel, 1989; Tamminga, 1992; Weimer, 1998). Estas pérdidas de CH₄ no son únicamente una pérdida importante de energía de la ración, sino que contribuyen al efecto invernadero y al calentamiento del planeta (Tamminga, 1992). Durante muchos años se han intentado reducir estas pérdidas energéticas de la ración disminuyendo la metanogénesis. Los ionóforos alteran los productos de fermentación de la digestión microbiana ruminal al reducir la población bacteriana productora de H₂ y CO₂ (Van Nevel y Demeyer, 1977). Como las bacterias metanogénicas utilizan H₂ para reducir el CO₂ a CH₄, se reduce la síntesis y acumulación de CH₄ en el rumen. La especies inhibidas por la monensina son productoras de acetato y H₂, con lo cual se

reduce la relación acetato:propionato y la producción de metano. El resultado es la disminución de la proporción molar de acetato, butirato y metano, y el aumento de la proporción molar de propionato (Richardson *et al.*, 1976; Russell y Strobel, 1988; Yang y Russell, 1993b; Garcia-Lopez *et al.*, 1996). La producción de ácido propiónico es energéticamente más eficiente, ya que reduce las pérdidas energéticas en forma de gases de fermentación (CH₄ y CO₂) asociados a la producción de ácido acético y butírico. Además, debido al cambio en la relación acetato:propionato, los ionóforos reducen el riesgo de meteorismo al disminuir la producción de CH₄ y CO₂.

Por otro lado, los ionóforos también son efectivos en el mantenimiento del pH ruminal y en la prevención de la acumulación de ácido láctico, evitando la acidosis (Russell y Strobel, 1989; McGuffey *et al.*, 2001). Las bacterias que producen lactato, *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus bovis*, que crecen rápidamente en dietas ricas en almidón, son sensibles a los ionóforos, mientras que aquellas bacterias que utilizan el lactato y lo transforman en propionato no son sensibles. Por lo tanto, los ionóforos disminuyen la producción de ácido láctico en el rumen, consiguiendo un pH más estable y reduciendo el riesgo de acidosis ruminal.

4.3. Efecto de los ionóforos sobre la degradación proteica

Los ionóforos interfieren en el metabolismo ruminal del N disminuyendo la degradación de la proteína. Su efecto es el resultado de la disminución de la proteólisis ruminal y la desaminación de aminoácidos, resultando en una disminución de la producción de amoníaco (Van Nevel y Demeyer, 1977; Russell y Strobel, 1989; McGuffey *et al.*, 2001).

En varios estudios, la suplementación con monensina disminuyó la concentración de amoníaco en el líquido ruminal tanto *in vitro* como *in vivo*, como consecuencia de la inhibición de la desaminación (Richardson *et al.*, 1976; Russell y Strobel, 1988). Yang y Russell (1993b) observaron una disminución del 30% de la concentración de amoníaco en animales tratados con monensina y alimentados con un exceso de proteína degradable. La disminución de 10 veces en la concentración de bacterias HAP sugiere que la disminución de amoníaco fue debida a la reducción de la desaminación por parte de la monensina al inhibir a parte de esta población bacteriana. Además, la reducción de

la degradación de aminoácidos y péptidos parece mejorar la producción de proteína bacteriana (Cotta y Russell, 1982; Griswold, 1996) e incrementar el flujo ruminal de proteína microbiana (Yang y Russell, 1993b; Lana y Russell, 1997).

Sin embargo, el efecto de los ionóforos sobre la degradación proteica puede variar según la composición de la ración. En raciones con un alto porcentaje de forraje, la disminución del amoníaco puede ser mayor que en raciones con más concentrado, donde los niveles de amoníaco son bajos debido a la mayor presencia de carbohidratos fácilmente fermentables. La mayor producción de amoníaco en animales alimentados con una ración basada en forraje debido a la mayor presencia de bacterias HAP (Rychlik y Russell, 2000), puede ser el motivo de que el efecto de los ionóforos se potencie en estas raciones. Por otro lado, el efecto de los ionóforos también puede modificarse en función de la fuente proteica y el nivel de proteína de la ración. Lana *et al.* (1997) observaron en terneras alimentadas con una ración alta en concentrado que la monensina mejoró la eficiencia alimentaria y la utilización de nitrógeno en terneras suplementadas con harina de soja, pero no en aquellas suplementadas con urea. Este resultado era de esperar, ya que la monensina actúa inhibiendo la desaminación de aminoácidos, y no la degradación de urea. Por otro lado, la suplementación con monensina tuvo un efecto mayor sobre la eficiencia alimentaria y la eficiencia de utilización de N en las terneras alimentadas con una ración baja en proteína (13.5%) que en las terneras alimentadas con una ración alta en proteína (16.7%) (Lana *et al.*, 1997).

C. La alternativa de los aceites esenciales

1. Introducción

Los antibióticos promotores de crecimiento han aumentado la eficiencia de producción del rumiante modificando el metabolismo energético y proteico. Sin embargo, los efectos adversos de estos aditivos, por su capacidad de crear resistencias cruzadas con los antibióticos utilizados en medicina humana, y la desconfianza de los consumidores europeos hacia los aditivos utilizados en la alimentación animal, han dado lugar a su prohibición en alimentación animal (Reglamento 1831/2003/CE).

En la alimentación animal, como en la humana, existe una tendencia generalizada al rechazo de todo lo que no sea natural. Esta tendencia ha dado lugar al estudio de los extractos de plantas como una de las alternativas más naturales a los antibióticos promotores del crecimiento.

Los extractos de plantas son compuestos naturales a los que se les atribuyen propiedades antisépticas, antifúngicas, antioxidantes, antitumorales, etc...(Thompson, 1986; Aureli *et al.*, 1992; Uedo *et al.*, 1999; Youdim y Deans, 1999). El efecto antimicrobiano de estas sustancias se conoce y se ha utilizado desde hace siglos (Hoffmann y Evans, 1911). Parece ser que actúan desestabilizando la membrana celular de algunos microorganismos, alterando las propiedades de su superficie. En rumiantes, estos aditivos podrían mejorar la eficiencia de utilización de los alimentos modificando la estructura de la población microbiana y, en consecuencia, el perfil de fermentación ruminal.

2. Extractos de plantas

Las plantas tienen una gran capacidad para sintetizar metabolitos secundarios, algunos de los cuales son responsables de su olor (terpenos), pigmentación (quinonas y taninos) o sabor (terpenos). Además, muchas de estas sustancias le sirven a la planta como mecanismo de defensa contra el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros.

Muchos extractos de plantas se utilizan como agentes antimicrobianos, ya que han demostrado poseer la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano (Aureli *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1995). Los principios activos de los extractos de plantas que ejercen el efecto antimicrobiano suelen ser sustancias químicas como los compuestos fenólicos, las cumarinas, los flavonoides, los taninos, las quinonas, etc... Estos compuestos se pueden dividir en varias categorías según su potencial antimicrobiano y su estructura molecular (Cowan, 1999). Los compuestos fenólicos y los terpenoides son dos de los grupos más importantes, donde podemos encontrar los componentes principales y mayoritarios de los extractos de plantas con mayor actividad antimicrobiana.

Uno de los extractos de planta más estudiados como aditivo en producción animal es el extracto de yuca o el extracto de la planta del desierto *Yucca shidigera*. El extracto de yuca contiene dos componentes principales: la fracción sarsaponina (glicofracción esterooidal) y la fracción saponina. Los dos principios activos del extracto pueden afectar al metabolismo del N en el rumen por diferentes vías. La sarsaponina esterooidal (Figura 8) es un triterpeno que pertenece a los compuestos terpenoides y tiene la capacidad de fijar el N amoniacal. Por otro lado, las saponinas pueden afectar a la concentración de amoníaco indirectamente por su toxicidad frente a bacterias ruminales. La suplementación con extracto de yuca suprimió el crecimiento de *Streptococcus bovis* y *Butyrivibrio fibrisolvens* (Wallace *et al.*, 1994), dos de las especies bacterianas con mayor actividad proteolítica. Además, la fracción saponina de la yuca tienen una fuerte actividad antiprotozoaria que puede utilizarse como agente defaunante en rumiantes (Wallace *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1998; Hristov *et al.*, 1999).

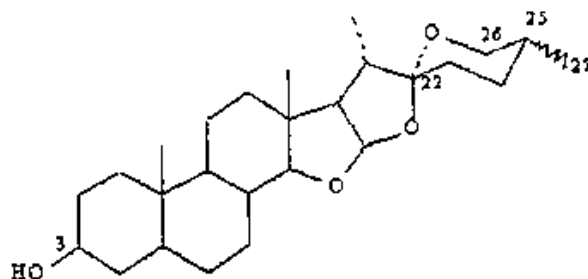


Figura 8. Estructura molecular de la fracción sarsaponina esterooidal.

La aplicación de este extracto como aditivo en la producción animal ha dado lugar a respuestas muy variables. Valdez *et al.* (1986) observaron un incremento de la digestibilidad ruminal de la MO y FAD con la adición de extracto de yuca *in vitro*. Hristov *et al.* (1999) observaron un aumento de la proporción de propionato en el rumen de terneras suplementadas con extracto de yuca. Sin embargo, Wu *et al.* (1994) no observaron diferencias en la digestibilidad ruminal de la MO y FAD en terneras suplementadas con extracto de yuca.

La capacidad del extracto de yuca de mejorar la eficacia de retención del nitrógeno es muy atractiva para el vacuno lechero. Sin embargo, los efectos sobre el metabolismo nitrogenado han sido muy variables: algunos estudios observaron una reducción de la concentración de amoníaco *in vitro* (Wallace *et al.*, 1994; Sliwinski *et al.*, 2002) e *in vivo* (Hussain y Cheeke, 1995; Hristov, *et al.*, 1999); otros estudios no encontraron una disminución significativa de la concentración de amoníaco (Valdez *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1998); y otros observaron una reducción de la concentración de amoníaco que desapareció como consecuencia de la adaptación de la flora ruminal al extracto (Wang *et al.*, 1998). Las razones de las diferentes observaciones tanto *in vitro* como *in vivo* se desconocen, pero pueden estar relacionadas con el tamaño total del pool de N amoniacal y su relación con la dosis del extracto de yuca incluida en el sistema.

3. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son extractos de plantas obtenidos mediante la extracción con solventes orgánicos y destilación. Estos extractos son una combinación de diversas moléculas, principalmente formadas por hidrocarburos cíclicos y sus alcoholes, aldehídos o ésteres derivados. Las propiedades del aceite esencial pueden variar según su composición. Inouye *et al.* (2001) observaron que los aceites esenciales que contenían un aldehído o un fenol como principal componente fueron los más activos frente a bacterias del tracto respiratorio, seguidos por los alcoholes y, con una menor acción antimicrobiana, los aceites que contenían mayoritariamente cetonas, ésteres o hidrocarburos. La actividad de un aceite esencial está relacionada con sus componentes principales, la configuración estructural y grupos funcionales de sus compuestos, y con posibles sinergias entre los compuestos (Dorman y Deans, 2000). En consecuencia, hay que diferenciar entre la mezcla total del aceite esencial de una planta y cada uno de sus

compuestos activos. Por este motivo se han estudiado paralelamente las propiedades de los aceites esenciales y de sus componentes principales.

La capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales se está investigando tanto en la industria alimentaria y farmacéutica, donde se ha demostrado la efectividad de los aceites esenciales como antimicrobianos o antisépticos frente a bacterias patógenas, como en producción animal (Tabla 11). Los aceites esenciales son una alternativa muy interesante para reemplazar a los promotores de crecimiento, mejorar la producción y reducir la contaminación ambiental. En rumiantes, su capacidad antimicrobiana parece actuar inhibiendo selectivamente a una parte de la población microbiana ruminal resultando en una reducción de las pérdidas energéticas y/o proteicas a nivel ruminal.

Sin embargo, la mayoría de investigaciones que demuestran la actividad antimicrobiana de estos extractos han evaluado la acción de un aceite esencial o uno de sus compuestos activos frente a un microorganismo en un medio de cultivo puro de especies patógenas para el hombre, o como conservantes de alimentarios. Pocos estudios han demostrado el efecto de estos aceites en un ecosistema microbiano ruminal o en cultivos puros de determinadas cepas microbianas ruminales, y sólo pueden sugerir el efecto real de los aceites esenciales en el ecosistema ruminal.

3.1. Composición de los aceites esenciales

Para la obtención de un aceite esencial, la parte de la planta que lo contiene se somete a una hidrodestilación. El aceite esencial que se encuentra en el vapor de agua se extrae mediante un disolvente orgánico, separando el aceite de la fase de vapor. Al final del proceso se obtiene el aceite esencial ligado al disolvente orgánico (Consentino *et al.*, 1999; Bagamboula *et al.*, 2004).

El análisis de la composición química de los aceites esenciales se lleva a cabo mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (Guillén y Manzano, 1998). Con esta metodología se observa como la composición de los principios activos del extracto es variable y dependiente de la variedad de la planta y las condiciones de cultivo. Los aceites esenciales pueden llegar a tener más de 100 principios activos (Gustafson *et al.*,

1998). Por ejemplo, Guillén y Manzanos (1998) identificaron un total de 171 compuestos en el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.

Tabla 10. Composición de tres aceites esenciales de orégano.

Componentes	Composición de los aceites esenciales (%)		
	<i>Origanum comercial</i>	<i>O.vulgar ssp. hirtum</i>	<i>O. dictamnus</i>
γ -terpineno	1.32	2.07	11.41
<i>p</i> -cimeno	40.15	8.76	13.49
Timol	31.80	2.45	0.44
Carvacrol	0.43	79.58	62.44

Fuente: Adaptado de Sivroupoulou *et al.* (1996)

Además, su composición varía según la variedad. Así, Sivropoulou *et al.* (1996) observaron que las principales diferencias entre los aceites esencial de tres variedades de orégano (*Origanum comercial*, *O. vulgare ssp. hirtum* y *O. dictamnus*) se encontraron en sus principales componentes, dos fenoles monoterpenos (carvacrol y timol) y sus dos precursores (γ -terpinene y *p*-cymene) (Tabla 10). Los aceites esenciales ricos en compuestos fenólicos (carvacrol, timol) poseen una mayor capacidad antimicrobiana (Tabla 11), por lo que es importante conocer la concentración de estos principios activos en el aceite esencial de la variedad de la planta. En este estudio se observó que la concentración de timol varió del 0.44 a 31.8 %, y la de carvacrol varió de 0.43 a 79.6 %, según la variedad de orégano (Tabla 10).

Tabla 11. Actividad antimicrobiana (diámetro de inhibición, mm) de tres aceites esenciales de orégano y sus principales componentes.

Aceites/ Compuestos	Cepas bacterianas					
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>B. subtilus</i>
<i>O. comercial</i>	12	2	11	17	33	29
<i>O. dictamnus</i>	19	2	13	9	24	30
<i>O. vulgare</i>	15	3	16	15	24	27
γ -terpinene	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -cymene	-	2	-	-	-	-
Timol	16	3	18	23	25	26
Carvacrol	26	3	23	16	34	24

Fuente: Sivropoulou *et al.* (1996)

Por otra parte, la acción antibacteriana del aceite de tomillo también esta relacionada con los componentes fenólicos predominantes, timol y cavacrol. Juven *et al.* (1994)

observaron que la concentración de timol (41%), carvacrol (3.6%), *p*-cymene (35%) y γ -terpinene (6%) constituyeron aproximadamente el 86% del aceite esencial de tomillo. Consentino *et al.* (1999) observaron la existencia de compuestos químicos diferentes entre los aceites de tomillo extraídos de diferentes especies o variedades. El timol fue el compuesto mayoritario pero la concentración varió entre especies (entre 29 y 50 %), como también las cantidades de carvacrol y *p*-cymene.

La composición de los aceites esenciales de plantas puede llegar a variar mucho dependiendo de la variedad (propiedades determinadas genéticamente), la zona geográfica o climatología (medio ambiente), la edad de la planta, la parte utilizada en la extracción, y el método de secado y extracción del aceite (Guillén y Manzanos, 1998; D'Antuono *et al.*, 2000; Bagamboula *et al.*, 2004). Estas variaciones influyen decisivamente en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Estos factores de variación hacen que la estandarización y la comparación de los resultados obtenidos por la acción de los aceites esenciales sea bastante difícil, ya que no sólo es muy variable el contenido de principios activos en diferentes variedades de una misma planta, si no que se utilizan diferentes técnicas de evaluación, y cepas bacterianas.

3.2. Propiedades de los aceites esenciales

Existen muchos trabajos en la bibliografía que demuestran la actividad antibacteriana en medios de cultivo de diferentes aceites esenciales y de algunos de sus componentes frente a una gran variedad de bacterias patógenas (Tabla 12). La mayoría de estos trabajos coinciden en que uno de los aceites con mayor potencial bacteriostático y bactericida es el aceite esencial de tomillo. Entre los componentes de diferentes aceites esenciales con mayor actividad y con un amplio espectro de efectividad antimicrobiana encontramos: el timol (tomillo, orégano), el carvacrol (orégano y tomillo), el cinemaldehído (canela) y el eugenol (canela, clavo y pimienta).

Los aceites esenciales no sólo inhiben el crecimiento de la bacteria, sino que también poseen la capacidad de inhibir la germinación de esporas, como en el caso de *Clostridium botulinum* o *Bacillus cereus* (Ismail y Pierson, 1990; Chaibi *et al.*, 1997), y tienen la capacidad de alterar la patogenicidad de las bacterias alterando la producción de toxinas. Smith-Palmer *et al.* (2002) demostraron que el aceite de *Thymus vulgaris*, además de tener una buena actividad antimicrobiana contra *L. Monocytogenes*, alteró la

producción de toxinas de esta bacteria patógena y redujo la producción de dos proteínas extracelulares claves para su patogenicidad.

Tabla 12. Efecto antibacteriano de aceites esenciales y principios activos.

Referencia	Aceite esencial	Compuesto	Microorganismo
Aureli <i>et al.</i> (1992)	Canela; clavo; orégano; tomillo		<i>L. innocua</i> ; <i>L. monocytogenes</i>
Chaibi <i>et al.</i> (1997)	Camomila; naranja; eucalipto; romero...		<i>B. cereus</i> ; <i>C. botulinum</i>
De <i>et al.</i> (1999)	Canela; clavo; nuez moscada	Eugenol	<i>B. subtilis</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>S. cerevisiae</i>
Ettayebi <i>et al.</i> (2000)		Timol + (nisina)	<i>B. subtilis</i> ; <i>L. monocytogenes</i>
Evans y Martin (2000)		Timol	<i>S. bovis</i> ; <i>S. ruminantium</i>
Helander <i>et al.</i> (1998)		Carvacrol; timol	<i>E. coli</i> ; <i>S. typhimurium</i>
Hoffmann y Evans (1911)	Canela; clavo	Cinnamic; eugenol	
Inouye <i>et al.</i> (2001)	Canela; limón; tomillo		<i>H. influenzae</i> ; <i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>S. aureus</i>
Ismail y Pierson (1990)	Ajo; canela; clavo, cebolla; orégano; pimienta; tomillo		<i>C. botulinum</i>
Juven <i>et al.</i> (1994)	Tomillo	Carvacrol; timol	<i>S. aureus</i> ; <i>S. typhimurium</i>
Karaman <i>et al.</i> (2001)	Tomillo		<i>B. cereus</i> ; <i>B. megaterium</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>L. monocytogenes</i> ; <i>M. luteus</i> ; <i>M. s megmatis</i> ; <i>P. vulgaris</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i>
Naganawa <i>et al.</i> (1996)	Ajo		<i>B. cereus</i> ; <i>B. subtilis</i> ; <i>S. griseus</i>
Nakamura <i>et al.</i> (1999)	<i>O. gratissimum</i> L.	Eugenol	<i>E. coli</i> ; <i>Klebsiella sp.</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>S. enteritidis</i> , <i>S. aureus</i> ; <i>S. flexineri</i>
Nelson <i>et al.</i> (1997)	Árbol té, lavanda, menta, tomillo		<i>E. faecium</i> ; <i>S. aureus</i>
Singh <i>et al.</i> (2001)	Ajo + (nisina)		<i>L. monocytogenes</i>
Sivropoulou <i>et al.</i> (1995;1996)	Orégano Menta		<i>B. subtilis</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>R. leguminosarum</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>S. typhimurium</i>
Smith-Palmer <i>et al.</i> (1998; 2002)	Canela; clavo; laurel; nuez m.; tomillo		<i>C. jejuni</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>L. monocytogenes</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>S. enteritidis</i>
Ultee <i>et al.</i> (1999;2002)		Carvacrol	<i>B. cereus</i>
Varel y Miller (2001)		Carvacrol; timol	<i>Coniformes fecales</i> ; <i>bacterias anaeróbicas</i>

Otros estudios han demostrado la actividad antifúngica de los aceites esenciales (Thompson, 1986; Karaman *et al.*, 2001; Daferera *et al.*, 2003). Mahmoud (1994) determinó el efecto de 20 principios activos de aceites esenciales sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas de una cepa toxicogénica de *Aspergillus flavus*. Sólo 5 compuestos (todos ellos aceites alifáticos, aldehídos aromáticos o fenoles), entre ellos el timol que fue efectivo a dosis inferiores al resto de aceites esenciales, suprimieron completamente el crecimiento y la síntesis de aflatoxinas. De nuevo, el timol y el eugenol demostraron su actividad antifúngica sobre el crecimiento y producción de toxinas de *Penicillium citrinum* en medios de cultivo y en alimentos (Vázquez *et al.*, 2001).

Algunos aceites esenciales, debido a su contenido en compuestos fenólicos, también poseen una cierta capacidad antioxidante. De nuevo, el aceite de tomillo es uno de los aceites esenciales con mayor actividad antioxidante. Youdim y Deans (1999) observaron que la suplementación del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. en la dieta de ratas disminuyó la capacidad oxidante enzimática en corazón e hígado. El extracto de clavo, otro de los aceites esenciales con mayor actividad, y sus principales compuestos, eugenol y acetato de eugenil, mostraron una actividad antioxidante comparable al antioxidante natural α -tocoferol, vitamina E (Lee y Shibamoto, 2001).

El D-limoneno es el monoterpeno monocíclico más abundante en el aceite esencial de los cítricos. Este principio activo posee la capacidad de inhibir el desarrollo de tumores espontáneos o provocados en roedores. Uedo *et al.* (1999) demostraron que la administración oral de limoneno inhibió la carcinogénesis gástrica de las ratas tratadas. Existen otros compuestos naturales de plantas que poseen efectos protectores frente a la genotoxicidad y la carcinogénesis. La ingestión en la dieta de compuestos quimiopreventivos es una estrategia efectiva para minimizar los efectos nocivos de genotoxinas y carcinógenos. El geranitol, un monoterpeno del aceite esencial de limoncillo o lemongrás, se presenta como una nueva clase de agentes para la quimiopreención. El geraniol inhibió el crecimiento de las células tumorales del cáncer de colon humano (Carnesecchi *et al.*, 2001). También el eugenol es conocido como un potente inhibidor de la peroxidación lipídica y puede poseer propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas (Rompelberg *et al.*, 1996). Abraham (2001)

demonstró el efecto antigenotóxico del pretratamiento con eugenol en ratones, inhibiendo la mutagénesis provocada por la aflatoxina B1.

3.3. Aceite esencial de *Thymus* y *Origanum*

Entre las plantas aromáticas que pertenecen a la familia Lamiaceae, destaca el género *Thymus* (350 especies) y el género *Origanum* (36 especies) por el gran número de especies y variedades que crecen de forma salvaje. Estas plantas se utilizan como hierbas culinaria, frescas o secas, y sus aceites esenciales se utilizan como saborizante en una amplia variedad de comidas, bebidas y en el sector de la perfumería. Debido a sus propiedades antisépticas, antiespasmódicas y antimicrobianas, también se utilizan como plantas medicinales.

El análisis mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas mostró que la mayoría de compuesto de varios aceites de *Thymus* eran hidrocarburos monoterpenos y monoterpenos fenólicos (Consentino *et al.*, 1999). Aunque su composición varía mucho dependiendo de la especie de tomillo analizado, los terpenos timol, *p*-cymene y carvacrol son los compuesto volátiles mayoritarios del aceite esencial de tomillo (Tabla 13). Bagamboula *et al.* (2004) encontraron un 45-47 % de timol y un 32-34 % de *p*-cymene en el aceite de tomillo. En este estudio el tomillo fue de “tipo timol” donde predomina este compuesto. Por el contrario, el tomillo utilizado por Ultee *et al.* (1998) fue de “tipo carvacrol” donde predominó con un 45-60 % el carvacrol.

Consentino *et al.* (1999) confirmaron que el alto contenido fenólico del aceite esencial de tomillo era el principal responsable de las propiedades antimicrobianas de este aceite esencial. Entre los compuestos evaluados del aceite esencial de tomillo, el carvacrol y el timol fueron los antimicrobianos más eficientes frente a las cepas bacterianas testadas. De hecho, la variedad de tomillo (*T. herba-baroma*) que se caracterizó por tener un contenido más elevado de fenoles entre los aceites analizados (67.5%), también demostró tener la mayor actividad antimicrobiana frente a las cepas bacterianas testadas.

En general, los aceites de tomillo y sus compuestos fueron más activos frente a levaduras y bacterias gram positivas que frente a bacterias gram negativas (Consentino *et al.*, 1999; Bagamboula *et al.*, 2004). El carácter lipofílico de los compuestos fenólicos

explica la capacidad antimicrobiana del aceite de tomillo, debido a su capacidad de incorporarse a la membrana lipídica de la célula microbiana. Por el contrario, la dificultad que tienen los compuestos fenólicos, al ser lipofílicos, para difundirse a través de la membrana externa de las bacterias gram negativas explica su menor actividad antibacteriana frente a estas bacterias (Bagamboula *et al.*, 2004).

Tabla 13. Compuestos mayoritarios de algunos aceites esenciales con propiedades antimicrobianas.

Nombre común del aceite esencial	Nombre científico de la planta	Compuestos mayoritarios	Composición % aproximada
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i> (hojas inmaduras)	Linalool E-2-decanal	26% 20%
Coriandro	<i>Coriandrum satibum</i> (semillas)	Linalool E-2-decanal	70% -
Canela	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinamaldehido	65%
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacol Timol γ -terpineno <i>p</i> -cimeno α -pineno	Rastro-80% Rastro-64% 2-52% Rastro-52%
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pineno Bornil acetato Canfor 1,8-cineol	2-25% 0-17% 2-14% 3-89%
Salvia	<i>Salvia officinalis L.</i>	Canfor α -pineno β -pineno 1,8-cineol α -tujeno	6-15% 4-5% 2-10% 6-14% 20-42%
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol Eugenil acetato	75-85% 8-15%
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol Carvacrol γ -terpineno <i>p</i> -cimeno	10-64% 2-11% 2-31% 10-56%

Fuente: Adaptado de Burt (2004)

Dorman y Deans (2000) observaron que el aceite con mayor espectro de acción fue el de *Thymus vulgaris*, seguido por *Origanum vulgare spp. hirtum*, entre seis aceites esenciales. El aceite esencial de *Origanum vulgare* actúa como antimicrobiano frente a bacterias gram positivas y negativas con la misma eficacia (Dorman y Deans, 2000; Skandamis y Nichas, 2001; Nostro *et al.*, 2004). Sin embargo, *Thymus vulgaris*

demostró tener una mayor actividad antimicrobiana frente a las bacterias gram positivas (Dorman y Deans, 2000).

3.4. Susceptibilidad de las bacterias gram negativas y positivas

La mayoría de los estudios han observado que los aceites esenciales tienen una mayor actividad frente a las bacterias gram positivas que frente a las gram negativas (Smith-Palmer *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 2001). Las bacterias gram positivas sólo tienen una membrana, la membrana citoplasmática (Figura 9; Sikkema *et al.*, 1995). Por el contrario, las bacterias gram negativas tienen una membrana externa de fosfolípidos y lipopolisacáridos, además de la membrana citoplasmática. (Figura 7).

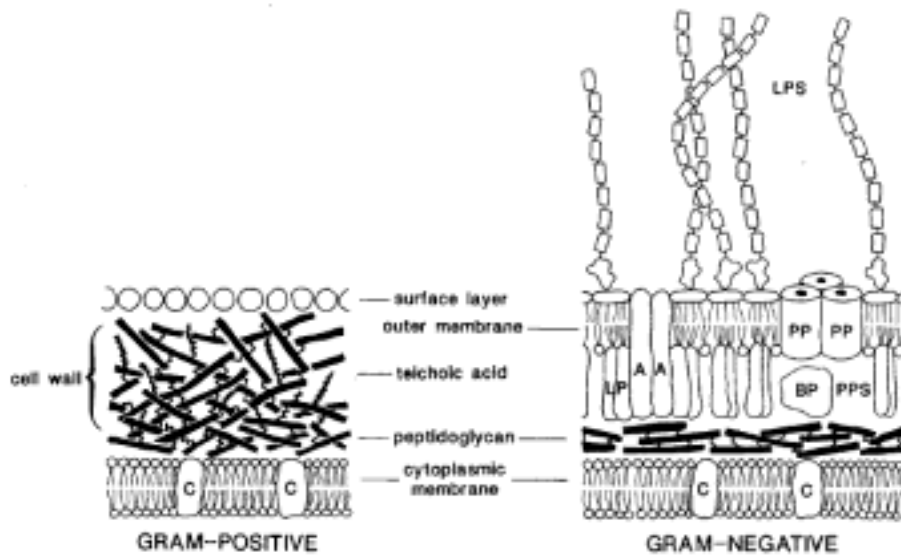


Figura 9. Esquema de las membranas celulares de las bacterias gram positivas y negativas: LPS, lipopolisacáridos; PP, poros; C, membrana citoplasmática y proteínas; BP, proteínas; PPs, espacio periplásmico; A, proteínas de membrana externa; LP, lipoproteínas. Fuente: Sikkema *et al.* (1995).

Las bacterias gram negativas son menos susceptibles a la acción antibacteriana ya que poseen una membrana externa alrededor de la pared celular, lo que restringe la difusión de los compuestos hidrofóbicos a través de su cobertura de lipopolisacáridos (Sikkema *et al.*, 1995). A pesar de la presencia de los poros de baja especificidad, la membrana externa tiene una permeabilidad muy baja hacia los compuestos hidrofóbicos, debido a

los lipopolisacáridos lipofílicos. Sin embargo, no todos los estudios demuestran que las bacterias gram positivas sean más susceptibles, ya que existen compuestos lipofílicos que penetran a través de la membrana externa de algunas bacterias. Dorman y Deans (2000) observaron que las bacterias gram positivas fueron más susceptibles que las bacterias gram negativas al aceite esencial de *Pelargonium graveolens* (geranio) y *Thymus vulgaris* (tomillo), e igualmente sensibles a los aceites esenciales de *Piper nigrum* (pimienta), *Syzygium aromaticum* (clavo), *Myristica fragrans* (nuez mozcada) y *Origanum vulgare* (orégano). Smith-Palmer *et al.* (1998) también observaron que las dos bacterias gram positivas, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, fueron más sensibles a la inhibición de los aceites esenciales que las tres bacterias gram negativas, *E. coli*, *S. enteritidis* y *C. jejuni*. Sin embargo, Inouye *et al.* (2001) observaron un alto grado de susceptibilidad de *H. influenzae* (bacteria gram negativa) hacia los aceites esenciales. Parece ser que la membrana externa no es totalmente impermeable a las moléculas hidrofóbicas, ya que algunas pueden atravesar lentamente sus poros. Helander *et al.* (1998) estudiaron el mecanismo de acción de los aceites esenciales sobre las bacterias gram negativas, y observaron que el timol y el carvacrol inhibían el crecimiento bacteriano atravesando la membrana externa de la bacteria e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. Esto sugiere que la toxicidad de los aceites esenciales sobre las bacterias gram negativas radica en el bajo peso molecular de los compuestos lipofílicos o hidrofóbicos. A pesar de su limitada solubilidad en agua, estos compuestos son capaces de penetrar dentro de las bacterias gram negativas e influir en su proliferación y patogenicidad.

3.5. Mecanismo de acción de los compuestos activos de los aceites esenciales

Los aceites esenciales y sus compuestos son activos frente a una amplia variedad de bacterias, incluidas las gram negativas (Sivropoulou *et al.*, 1996). Considerando la gran cantidad de compuestos químicos de diferentes grupos que podemos encontrar en los aceites esenciales, es evidente que la actividad antibacteriana no se atribuye únicamente a un mecanismo de acción específico, sino a varios mecanismos (Figura 10; Burt, 2004). Estos mecanismos son consecuencia de la acción de los aceites esenciales en varios puntos de la célula.

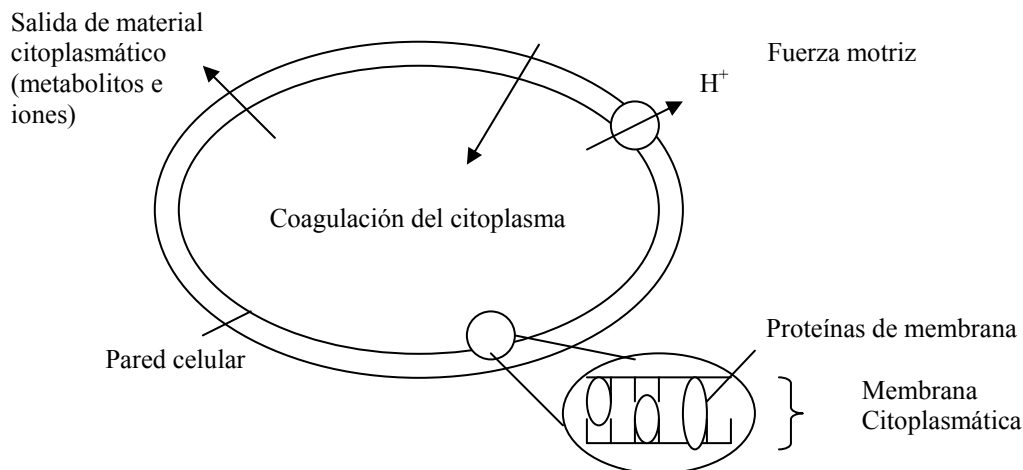


Figura 10. Localización y mecanismos de acción de los componentes de los aceites esenciales sobre la célula bacteriana: degradación de la pared celular (Helander *et al.*, 1998); daño de la membrana citoplasmática (Sikkema *et al.*, 1995; Ultee *et al.*, 2002); daño de las proteínas de membrana (Juven *et al.*, 1994; Ultee *et al.*, 1999); salida de contenido celular (Gustafson *et al.*, 1999; Helander *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 2001); coagulación del citoplasma (Gustafson *et al.*, 1998) y inhibición de la fuerza motriz de protones (Ultee *et al.*, 1999).

Una característica importante de los aceites esenciales y de sus componentes es la hidrofobicidad, la cual les permite unirse a los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, deshaciendo su estructura y provocando un aumento de su permeabilidad, dejando salir contenido celular (Sikkema *et al.*, 1995; Gustafson *et al.*, 1998, Helander *et al.*, 1998). Ultee *et al.* (1999; 2002) observaron una dilatación de la membrana del patógeno *Bacillus cereus* debido a la mayor fluidez de los lípidos de membrana como consecuencia de la interacción de la molécula de carvacrol, principio activo de los aceites esenciales de tomillo y orégano, entre otros, con los lípidos de membrana. La dilatación de la membrana citoplasmática provocó su desestabilización. Parece ser que la localización y el número de grupos hidroxilo (-OH) sobre el grupo fenol de estas moléculas está relacionado con su toxicidad: una mayor hidroxilación es responsable de una mayor capacidad bactericida. Ultee *et al.* (2002) sugirieron que la presencia del grupo hidroxilo en la molécula de carvacrol, al igual que en el timol, provoca la entrada de protones y el escape de iones potasio (Figura 11), la disminución del gradiente de

pH, el incremento del gasto de ATP y, finalmente, la muerte celular del patógeno *Bacillus cereus*.

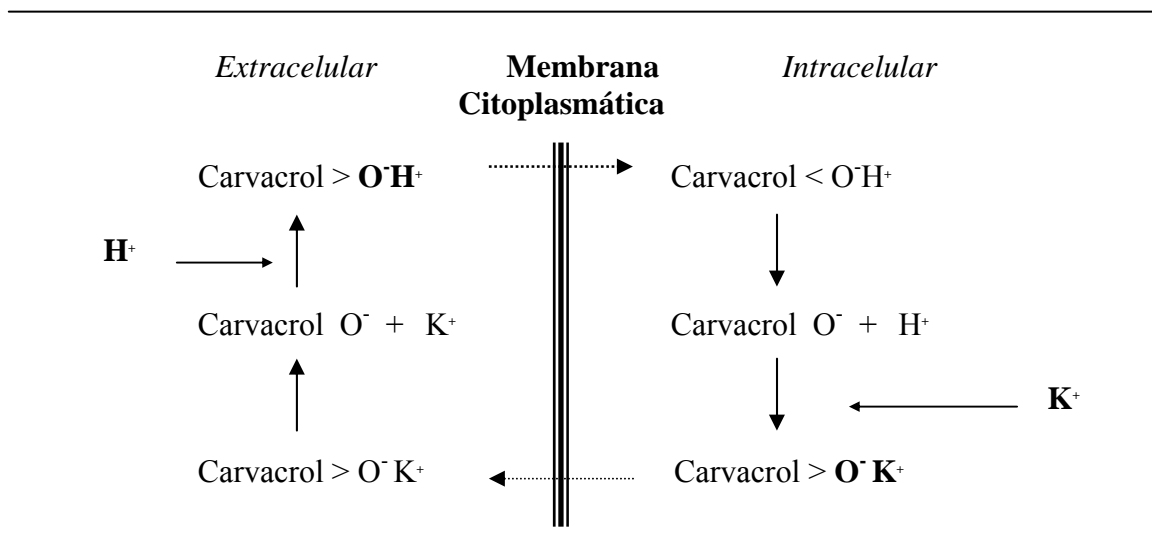


Figura 11. Esquema del mecanismo de acción sugerido para el carvacrol sobre la membrana citoplasmática. Fuente: Adaptado Ultee *et al.* (2002).

La pérdida de ATP en células expuestas a carvacrol y timol se había observado anteriormente (Helander *et al.*, 1998). Sin embargo, en este estudio se utilizaron bacterias gram negativas donde el mecanismo de acción puede ser diferente, ya que la membrana celular está recubierta por una membrana externa que actúa de barrera protectora frente a macromoléculas hidrofóbicas.

Los compuestos de aceites esenciales también pueden actuar sobre las proteínas de la membrana citoplasmática. Los hidrocarburos lipofílicos pueden acumularse en la doble capa lipídica e interferir en la interacción lípido-proteína. Además, también es posible una interacción directa entre los compuestos lipofílicos con la parte hidrofóbica de la proteína (Juven *et al.*, 1994; Dikkema *et al.*, 1995). Como consecuencia, pueden modificar la actividad de los enzimas que regulan la producción de energía o la síntesis de compuestos estructurales (Burt, 2004). Juven *et al.* (1994) también sugirieron que la inhibición de *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* por el aceite de tomillo fue debida a los enlaces hidrofóbicos y de hidrógeno que se establecen entre sus componentes fenólicos, como el timol, y las proteínas de membrana de las células

bacterianas, que cambiaron las características de permeabilidad de la membrana y la desestabilizaron.

3.6. Compuestos fenólicos

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales aparece en la mayoría de los casos asociada con compuestos fenólicos (Davidson y Naidu, 2000). Los compuestos con estructura fenólica, como el carvacrol, el eugenol y el timol, poseen una gran actividad contra una amplia variedad de microorganismos (Hammer *et al.*, 1999). Estos compuestos son muy activos debido a su carácter hidrofóbico (Dorman y Deans, 2000). Por el contrario, la ausencia del anillo fenólico explica la falta de actividad del mentol comparado con el carvacrol (Ultee *et al.*, 2002) o del monoterpeno hidrocarburo cíclico *p*-cymene (Dorman y Deans, 2000).

La estructura química de los compuestos de los aceites esenciales determina el mecanismo de acción y la capacidad antimicrobiana (Figura 12). Algunos estudios han confirmado la importancia del grupo hidroxilo y su localización en la estructura fenólica para obtener una mayor capacidad antimicrobiana (Dorman y Deans, 2000; Ultee *et al.*, 2002). Así, los fenoles timol y carvacrol, seguidos por el eugenol, fueron los compuestos con mayor actividad antifúngica (Consentino *et al.*, 1999). Voda *et al.* (2003) también demostraron la importancia de la posición del grupo funcional en el anillo aromático de los compuestos, estudiando la capacidad antifúngica de 22 compuestos de aceites esenciales, 14 de ellos compuestos fenólicos. El mecanismo de toxicidad fenólica frente a los hongos se basa en la inhibición de enzimas fúngicos, posiblemente a través de reacciones con un grupo sulfidril o a través de interacciones no específicas con proteínas (Cowan, 1999). Dorman y Deans (2000) también observaron que el carvacrol y el timol actuaban de forma diferente frente a especies bacterias gram negativas y positivas. Sin embargo, en otros estudios no se observó la importancia de la posición del grupo hidroxilo, y la capacidad antibacteriana del timol y carvacrol fue similar (Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002).

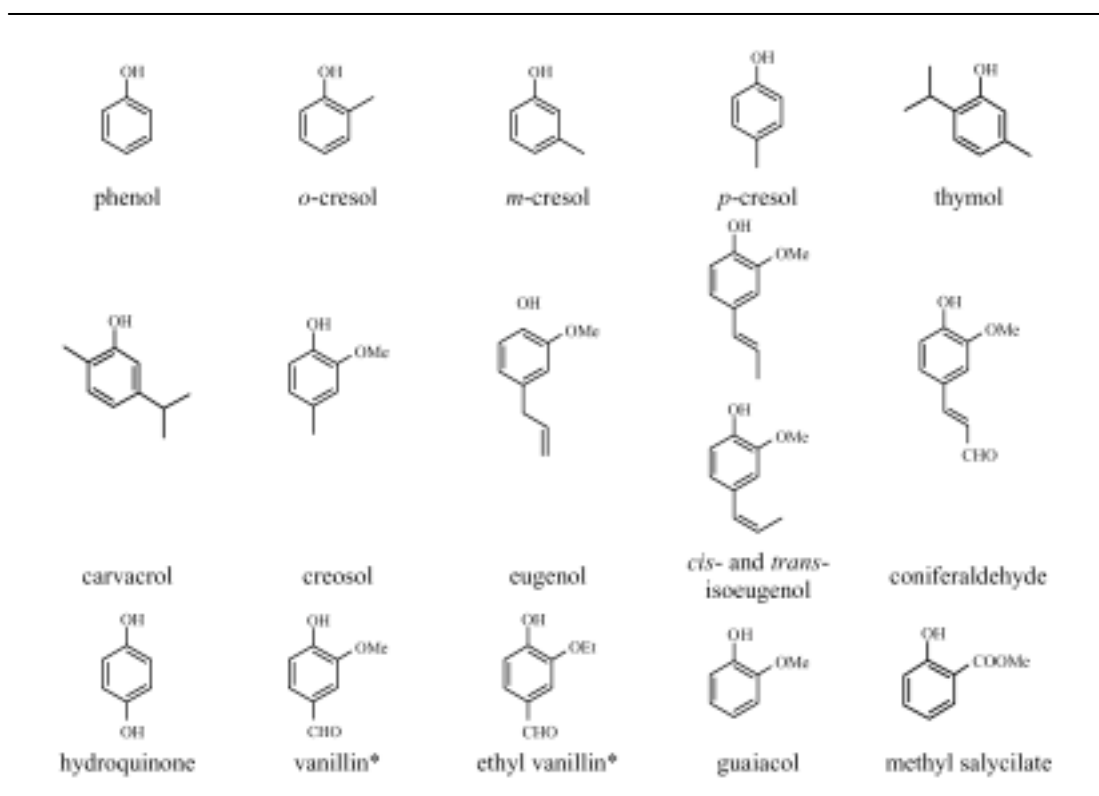


Figura 12. Compuestos fenólicos de aceites esenciales.

3.6.1. Timol, Carvacrol y Eugenol

Entre siete aceites esenciales evaluados frente a 25 cepas bacterianas, el timol fue el compuesto con un mayor espectro de entre 31 compuestos, seguido por el carvacrol y el eugenol (Dorman and Deans, 2000).

Los efectos y el mecanismo de acción del timol y el carvacrol, dos componentes importantes en el aceite de tomillo y orégano, han recibido gran atención por parte de los investigadores. Ambas sustancias actúan aumentando la permeabilidad de la membrana celular, tienen la capacidad de desintegrar la membrana externa de las bacterias gram negativas e incrementar la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Lambert *et al.*, 2001).

El carvacrol interacciona con la membrana celular uniéndose a la bicapa de fosfolípidos, provocando la desestabilización de la membrana, incrementando la fluidez de la membrana e incrementando la permeabilidad pasiva de la membrana. También se ha observado el paso de metabolitos celulares a través de la membrana celular. El nivel de

ATP dentro de la célula disminuye pero no incrementa fuera de la célula. Esto significa que la síntesis de ATP disminuye o que la hidrólisis incrementa. El potencial de membrana también disminuye, debilitando la fuerza motriz de los protones y el gradiente de pH a través de la membrana (Ultee *et al.*, 1999; 2002).

El eugenol es el compuesto mayoritario (aproximadamente el 85%) del aceite de clavo (*Syzygium aromaticum* o *Eugenia caryophyllata*) (Davidson and Naidu, 2000), y ha demostrado su potencial como un antimicrobiano fenólico frente a bacterias gram negativas y positivas (Dorman and Deans, 2000; Walsh *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2004).

Walsh *et al.* (2003) demostraron que tanto el timol como el eugenol poseían propiedades bactericidas y bacteriostáticas frente a las bacterias gram positivas y negativas evaluadas, aunque el timol demostró tener una capacidad antimicrobiana mayor a la del eugenol. En este estudio se volvió a confirmar que la membrana, debido a la salida de iones intracelulares (K^+), está implicada en el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos.

3.6.2. Efectos del Timol sobre la microflora ruminal

El timol (5-metil-2-isopropilfenol) es uno de los principales componentes que podemos encontrar en el aceite esencial de tomillo y de orégano (*Thymus* y *Origanum*). Como ya hemos visto, la propiedad antimicrobiana de estos dos aceites esenciales y sus compuestos (timol y carvacrol) se ha demostrado en varios estudios.

Existen pocos estudios del efecto de los aceites esenciales sobre el metabolismo ruminal. Borchers (1965) utilizó timol como inhibidor de la fermentación ruminal por su potente capacidad antimicrobiana. En la incubación de líquido ruminal con caseína en presencia de timol se observó una rápida acumulación de aminoácidos y un descenso de la concentración de amoníaco como consecuencia de la inhibición de la actividad desaminasa. Por el contrario, en ausencia de timol se observó una rápida acumulación de amoníaco y un ligero descenso en la concentración de aminoácidos. Estos resultados sugieren que la población bacteriana encargada de la fermentación de los aminoácidos se vio afectada por este compuesto antimicrobiano, al igual que sucede con los ionóforos. Del mismo modo, en la incubación de líquido ruminal con proteína

microbiana en presencia de timol se observó una disminución de la concentración de amoníaco y un aumento de la concentración de aminoácidos (Borchers, 1965).

La capacidad de atenuar la actividad de parte de la población bacteriana ruminal, además de inhibir el metabolismo proteico, puede modificar el perfil de fermentación bacteriano de forma similar a los promotores de crecimiento. Recientemente, Evans y Martin (2000) confirmaron la capacidad antibacteriana del timol sobre *S. bovis* y *S. ruminantium*, y demostraron su capacidad para modificar el metabolismo y perfil de fermentación ruminal. El timol redujo la concentración de CH₄ y lactato e incrementó el pH final, reduciendo el gasto energético y previniendo el riesgo de acidosis ruminal. Sin embargo, una dosis muy elevada de timol redujo la concentración tanto del acetato como del propionato. Estos cambios en el perfil de fermentación sugieren que redujo la degradación de los nutrientes, inhibiendo la fermentación ruminal.

El timol es uno de los principios activos más importantes de la mezcla de aceites esenciales utilizada en varios estudios como aditivo ruminal en el control de la degradación proteica ruminal (McIntosh *et al.*, 2003; Molero *et al.*, 2004; Newbold *et al.*, 2004). Esta mezcla de compuestos de aceites esenciales, Crina® para rumiantes (AKZO NOBEL/CRINA S.A, Gland, Switzerland), parece estar actuando a varios niveles sobre el metabolismo proteico. En varios estudios *in situ*, la adición de esta mezcla de compuestos de aceites esenciales actuó inhibiendo la degradación de la proteína (Molero *et al.*, 2004; Newbold *et al.*, 2004), aunque se observó una cierta variabilidad dependiendo del sustrato proteico estudiado. Además, en investigaciones *in vitro*, se observó una disminución de la concentración de amoníaco en el líquido ruminal de animales suplementados con esta mezcla de compuestos de aceites esenciales, resultado de la inhibición de la desaminación (McIntosh *et al.*, 2003; Newbold *et al.*, 2004). Aunque una mezcla impide el estudio detallado de sus principios activos, los estudios con esta mezcla han aportado las primeras evidencias del efecto los aceites esenciales sobre un ecosistema ruminal, ya que hasta ahora, la mayoría de estudios únicamente habían demostrado la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales frente determinadas cepas bacterianas en medios de cultivos puros.

3.7. Sinergismo y antagonismo entre los compuestos de aceites esenciales

La actividad inherente de cada aceite está relacionada con la configuración química de los compuestos, sus proporciones y la interacción entre ellos (Dorman y Deans, 2000). Los efectos aditivos, sinérgicos o antagonistas entre algunos compuestos pueden afectar a la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Un efecto aditivo se observa cuando los efectos combinados son igual a la suma de los efectos individuales. El sinergismo se observa cuando el efecto de la combinación de sustancias es mayor que la suma de los efectos individuales. El antagonismo se observa cuando los efectos de uno o varios compuestos es menor cuando están juntos que cuando se evalúan por separado.

Cosentino *et al.* (1999) observaron una actividad inferior en algunas variedades de *Thymus* con alto contenido en *p*-cymene y sugirió que este compuesto ejercía un efecto antagónico frente al efecto de los fenoles. Sin embargo, Lambert *et al.* (2001) observaron un efecto aditivo entre los dos compuesto mayoritarios del aceite de orégano, carvacrol y timol, frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Además, la combinación de aceites esenciales con otras sustancias antimicrobianas puede reducir la dosis óptima y favorecer su mecanismo de acción. Ettayebi *et al.* (2000) observaron un efecto sinérgico entre el timol y la nisina, bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, a una dosis efectiva inferior a la de los dos compuestos por separado. Singh *et al.* (2001) también demostraron un efecto sinérgico entre la nisina y el aceite esencial de ajo frente a *L. monocytogenes*. La inhibición completa del crecimiento bacteriano a dosis de subinhibición de los dos antimicrobianos sugiere que la desestabilización de la membrana bacteriana por parte del aceite esencial provocó un incremento en la permeabilidad y favoreció la actuación de la nisina.

3.8. Condiciones óptimas para desarrollar la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales y sus compuestos

La propiedad antimicrobiana de los aceites esenciales pueden potenciarse si las condiciones del medio son adecuadas para que el mecanismo de acción pueda actuar.

La actividad antibacteriana del aceite de tomillo y de su principal componente, el timol, se potenció bajo condiciones de anaerobiosis (Juven *et al.*, 1994). Juven *et al.* (1994) sugirieron que la menor obtención de energía en ausencia de oxígeno podría

incrementar la sensibilidad de los microorganismos a la toxicidad del aceite. Además, la oxidación de los componentes fenólicos bajo condiciones de aerobiosis podría explicar la inactivación parcial de su actividad sobre la membrana bacteriana. La posibilidad de utilizar aceites esenciales como aditivos ruminales se ve reforzada con esta observación, ya que el medio ruminal es siempre un medio anaeróbico que favorecería el mecanismo de acción de estos aditivos.

Juven *et al.* (1994) también observaron que la capacidad antibacteriana del aceite de tomillo y del timol era mayor a pH 5.5 comparada con la actividad del aceite a un pH 6.5. Parece ser que a un pH bajo, la molécula de timol está mayoritariamente no disociada, por lo tanto es más hidrofóbica, y puede unirse mejor a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana y disolverse mejor en la fase lipídica de la membrana bacteriana. Sin embargo, esta característica afectaría negativamente a su actividad frente a bacterias gram negativas. Tal vez las condiciones de producción de terneras de engorde serían las adecuadas para estos aditivos, ya que el tipo de dieta con un mayor nivel de concentrado mantiene un pH más ácido en el medio ruminal.

La efectividad de los aceites esenciales no sólo se ve modificada por la presencia de oxígeno o el pH del medio, sino que también depende de la temperatura. Algunos aceites esenciales pierden su capacidad antimicrobiana a temperaturas de refrigeración. Se cree que la temperatura no permite la penetración del aceite en la célula bacteriana, aunque el aceite de tomillo mantiene su capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano a 4°C (Smith-Palmer *et al.*, 1998). Sin embargo, dado que el rumen se encuentra a una temperatura constante entre 38 y 40 °C, este aspecto sería poco relevante en el uso de los aceites esenciales y sus compuestos como aditivos ruminales.

3.9. Aspectos legales del uso de los aceites esenciales y sus compuestos

La mayoría de los aceites esenciales y sus compuestos se clasifican como aditivos alimentarios GRAS (Generally Recognized As Safe; 21 CFR 182). En Estados Unidos, la Agencia Norteamericana para la regulación de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration, FDA; www.cfsan.fda.gov) posee una lista de sustancias (Everything Added to Food in US, EAFUS; <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/eafus.html>) donde aparecen las sustancias GRAS, consideradas como sustancias seguras.

Estos aceites esenciales y sus compuestos están registrados por la Comisión Europea como saborizantes en alimentación. Los saborizantes registrados no presentan ningún riesgo para la salud del consumidor, y entre ellos podemos encontrar al timol, carvacrol, eugenol, limoneno, mentol, cinamaldehído, carvone y *p*-cymene (Burt *et al.*, 2004).

Entre las normativas vigentes para regular el uso de los aceites esenciales como saborizantes o sustancias aromáticas en alimentación animal podemos encontrar:

- La Directiva 88/388/CEE del Consejo, de 22 de Junio de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción (Diario Oficial nº L 184 de 15.7.1998).
- La Directiva 70/524/CEE del Consejo, del 23 de Noviembre de 1970, sobre los aditivos en la alimentación animal, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 1756/2002.
- Reglamento (CE) número 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal (Diario Oficial número L 268 de 18 de octubre de 2003).

Además, existen asociaciones como la Federación Europea de Aceites Esenciales (European Federation of Essential Oils, EFEO; www.efeo-org), creada en Junio del 2002 por asociaciones nacionales de países europeos (entre ellos España) que representa a compañías relacionadas con la producción y comercialización de aceites esenciales y sus materias primas, con el objetivo de informar, proteger y promover la producción de los aceites esenciales.

D. Conclusiones

Los antibióticos promotores del crecimiento todavía autorizados para su uso en alimentación animal (monensina sódica, salinomicina sódica, flavofosfolipol y avilamicina), quedarán prohibidos en Europa a partir del 1 de enero del 2006 (Reglamento 1831/2003/CE). Con la retirada forzosa de los promotores de crecimiento, la producción animal necesita de alternativas válidas al uso de aditivos de tipo antibiótico, apoyándose en una mejora del manejo y de la adopción de nuevas estrategias nutricionales.

La preocupación por el uso, y la prohibición de los antibióticos y otras sustancias utilizadas como aditivos en la alimentación de los animales ha despertado el interés por el estudio de otro tipo de aditivos, de origen natural, que carezcan de los posibles efectos nocivos que se atribuyen a los antibióticos. Los aceites esenciales representan una alternativa como agentes antimicrobianos del futuro, por su origen natural, que los hace más seguros para la población y para el medioambiente, y porque se consideran de bajo riesgo para desarrollar resistencias contra microorganismos patógenos. Se cree que es difícil para los patógenos crear resistencias debido a la mezcla de componentes del aceite, ya que parecen tener diferentes mecanismos de acción antimicrobiana.

Sin embargo, los estudios realizados para evaluar los efectos de los aceites esenciales sobre la fermentación microbiana en el rumen son, como hemos visto, muy escasos. Por esta razón, es necesario realizar estudios para conocer el efecto de los aceites esenciales sobre todo el ecosistema ruminal que nos permitan predecir la respuesta en los animales en producción.

E. Objetivos

Esta tesis doctoral se planteó por la escasa información que se dispone sobre el efecto de los aceites esenciales y de sus compuestos activos sobre la fermentación microbiana ruminal. Para ello, se trabajó con líquido ruminal de vacuno de leche y de ovejas de engorde utilizando varios sistemas de fermentación *in vitro*, principalmente un sistema de doble flujo continuo, con el fin de valorar el efecto de los compuestos de aceites esenciales sobre la fermentación microbiana ruminal como aditivo antimicrobiano y posible alternativa natural a los promotores de crecimiento para la producción animal.

Los objetivos experimentales fueron:

1. Determinar los efectos de una mezcla de compuestos de aceites esenciales sobre la fermentación microbiana ruminal y el flujo de nutrientes en un sistema de doble flujo continuo, y su interacción con el tipo de ración (una ración con alto contenido en forraje *vs* una ración con alto contenido en concentrado).
2. Determinar los efectos de la dosis de la mezcla de compuestos de aceites esenciales y el tiempo de adaptación sobre el metabolismo nitrogenado y el perfil de fermentación.
3. Determinar los efectos de algunos compuestos fenólicos derivados de extractos de plantas de forma individual, y sus dosis, sobre la fermentación microbiana ruminal.

F. Referencias Bibliográficas

- Aarts, H. F. M., E. E. Biewinga, y H. Van Keuleln. 1992. Dairy farming systems based on efficient nutrient management. *Neth. J. Agric. Sci.* 40:285-299.
- Abraham, S. K. 2001. Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. *Food Chem. Toxic.* 39:493-498.
- Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA). 1997-2001. <http://eea.eu.int>.
- Agricultural and Food Research Council (AFRC). 1993. Energy and protein requirements of ruminants. CAB-International. Wallingford, UK.
- Annison, E. F., y D. G. Armstrong. 1970. Volatile fatty acid metabolism and energy supply. En: *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*, 422-437. A. T. Phillipson, ed. Oriel Press, Ltd., Newcastle-upon-Tyne, England.
- Attwood, G. T., A. V. Klieve, D. Ouwerkerk, y B. K. C. Patel. 1998. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1796-1804.
- Aureli, P., A. Costantini, y S. Zolea. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55:344-348.
- Bagamboula, C. F., M. Uyttendaele, y J. Debevere. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 21:33-34.
- Berentsen, P. B. M., G. W. J. Giesen, y S. C. Verduyn. 1992. Manure legislation effects on income and on N, P and K losses in dairy farming. *Livest. Prod. Sci.* 31:43-56.
- Borchers, R. 1965. Proteolytic activity of rumen fluid *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 24:1033-1038.
- Buttery, P. J. 1988. Aspectos de la bioquímica de la fermentación ruminal y su implicación en la productividad de los rumiantes. En: *Avances en nutrición de los rumiantes*, 153-170. W. Haresign and D. J. A. Cole, eds. Acribia, Zaragoza.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94:223-253.
- Calsamiglia, S., y M. D. Stern. 1995. A tree-steps *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *J. Dairy. Sci.* 73:1459-1465.
- Carnesecchi, S., Y. Schneider, J. Ceraline, B. Durantou, F. J. Gosse, N. Seiler, y F. Raul. 2001. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and

- polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J. Pharm. Exp. Therap.* 298:197-200.
- Carro, M. D., y M. J. Ranilla. 2002. Aditivos antibióticos promotores del crecimiento: Situación actual y posibles alternativas. *Nutrición. Albéitar.* 56:46-49.
- Castillo, A. R., E. Kebreab, D. E. Beever, J. H. Barbi, J. D. Sutton, H. C. Kirby, y J. France. 2001a. The effect of energy supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *J. Anim. Sci.* 79:240-246.
- Castillo, A. R., E. Kebreab, D. E. Beever, J. H. Barbi, J. D. Sutton, H. C. Kirby, y J. France. 2001b. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *J. Anim. Sci.* 79:247-253.
- Chaibi, A., L. H. Ababouch, K. Belasry, S. Boucetta, y F. F. Busta. 1997. Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium Botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiol.* 14:161-174.
- Chase, L. E. 1998. Animal management strategies to reduce nutrient excretion. Proceeding from the Dairy Feeding Systems Management, Components, and Nutrients, 324-332. Conference Camp Hill, Pennsylvania.
- Chen, G., y J. B. Russell. 1989a. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1052-1057.
- Chen, G., y J. B. Russell. 1989b. Sodium-dependent transport of branched-chain amino acids by a monensin-sensitive ruminal peptostreptococcus. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2658-2663.
- Chen, G., y J. B. Russell. 1990. Transport and deamination of amino acids by a gram-positive, monensin-sensitive ruminal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2186-2192.
- Coll, D. 1995. La ganadería y la producción de residuos. En: *Zootecnia- Bases de Producción Animal. Tomo IV Genética, Patología, Higiene y Residuos Animales*, 243-300. C. Buxadé, ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi, y F. Palmas. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:130-135.
- Cotta, M. A., y J. B. Russell. 1982. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 65:226-234.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564-582.

- Daferera, D. J., B. N. Ziogas, y M. G. Polissiou. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop Prot.* 22:39-44.
- D' Antuono, L. F., G. C. Galletti, y P. Bocchini. 2000. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a north mediterranean area (Liguria Region, Northern Italy). *Ann. Botany.* 86:471-478.
- Davidson, P. M., y A. S. Naidu. 2000. Phyto-phenols. In: Natural food antimicrobial systems, 265-293. Naidu, A. S., eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
- De, M., A. K. De, y A. B. Barnerjee. 1999. Antimicrobial screening of some indian spices. *Phytotherapy Res.* 13:616-618.
- Dehority, B. A., H. W. Scott, y P. Kowaluk. 1967. Volatile fatty acid requirements of cellulolytic rumen bacteria. *J. Bacteriol.* 94:537-543.
- Departament d' Agricultura Ramaderia i Pesca (DARP).2002.<http://www.gencat.es/darp>
- Dou, R., R. A. Kohn, J. D. Ferguson, R. C. Boston, y J. D. Newbold. 1996. Managing nitrogen on dairy farms: an integrated approach I. Model description. *J. Dairy Sci.* 79:2071-2080.
- Dorman, H. J. D., y S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.
- Eschenlauer, S. C. P., N. McKain, N. D. Walker, N. R. McEwan, C. J. Newbold, y R. J. Wallace. 2002. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4925-4931.
- Ettayebi, K., J. El Yamani, y B. Rossi-Hassani. 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 129:1-10.
- Eurostat. 2002. Claude Vidal. Thirty years of agriculture EU. <http://www.datashop.com>.
- Eurostat. 2003. Duchateau, K and C. Vidal. Statistics in focus. Environment and Energy. <http://europa.eu.int/comm/eurostat>.
- Evans, J. D., y S. A. Martin. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.* 41:336-340.
- Farey, G. C., y L. L. Berger. 1993. El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church (eds). Ed. Acribia, Zaragoza.

- Garcia-Lopez, P. M., L. J. Kung, y J. M. Odom. 1996. *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9,10- Anthraquinone. *J. Anim. Sci.* 74:2276-2284.
- Gill, A. O., y R. A. Holley. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5750-5755.
- Griswold, K. E., W. H. Hoover, T. K. Miller, y W. V. Thayne. 1996. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 74:483-491.
- Guillén, M. D., y M. J. Manzanos. 1998. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. *Plant. Food Chemistry.* 63:373-383.
- Gustafson, J. E., Y. C. Liew, S. Chew, J. Markham, H. C. Bell, S. G. Wyllie, y J. R. Warmington. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:194-198.
- Hammer, K. A., C. F. Carson, y T. V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86:985-990.
- Helander, I. M., H-L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, y A. Von Wright. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46:3590-3595.
- Hoffmann, C., y A. C. Evans. 1911. The use of spices as preservatives. *J. Ind. Eng. Chem.* 835-838.
- Hoover, W. H., y S. R. Stokes. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74:3630-3644.
- Hristov, A. N., T. A. McAllister, F. H. Van Herk, K.-J. Cheng, C. J. Newbold, y P. R. Cheeke. 1999. Effect of *Yucca shidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J. Anim. Sci.* 77:2554-2563.
- Hussain, I., y P. R. Cheeke. 1994. Effect of dietary *Yucca shidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51:231-242.
- Inouye, S., T. Takizawa, y H. Yamaguchi. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* 47:565-573.

- Ismail, A., y M. D. Pierson. 1990. Inhibition of growth and germination of *C. Botulinum* 33^a, 40B, and 1623E by essential oil of spices. *J. Food Sci.* 55:1676-1678.
- Jonker, J. D., R. A. Kohn, y R. A. Erdman. 1998. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2681-2692.
- Juven, B. J., J. Kanner, F. Schved, y H. Weisslowicz. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituent. *J. Appl. Bacteriol.* 76:626-631.
- Karaman, S., M. Digrak, U. Ravid, y A. Ilcim. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacology.* 76:183-186.
- Kebreab, E., J. France, J. A. N. Mills, R. Allison, y J. Dijkstra. 2002. A dynamic model of N metabolism in the lactating dairy cows and an assessment of impact of N excretion on the environment. *J. Anim. Sci.* 80:248-259.
- Kim, J. M., M. R. Marshall, J. A. Cornell, J. F. Preston III, y C. I. Wei. 1995. Antibacterial activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *J. Food Sci.* 60:1364-1374.
- Klausner, S. D. 1989. Managing the land application of animal manures: agronomic considerations. En: Dairy manure management. Proceedings from the dairy manure management symposium, Syracuse, NY.
- Kohn, R. A., Z. Dou, J. D. Ferguson, y R. C. Boston. 1997. A sensitivity analysis of nitrogen losses from dairy farms. *J. Environ. Manag.* 50:417-428.
- Korevaar, H. 1992. The nitrogen balance on intensive Dutch dairy farms: a review. *Livest. Prod. Sci.* 38:17-27.
- Kuipers, A., F. Mandersloot, y R. L. G. Zom. 1999. An approach to nutrient management on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 2):84-89.
- Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, P. J. Coote, y G.-J. E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91:453-462.
- Lana, R. P., D. G. Fox, J. B. Russell, y C. Perry. 1997. Influence of Monensin on Holstein Steers Fed High-Concentrate Diets Containing Soybean Meal or Urea. *J. Anim. Sci.* 75:2571-2579.

- Lana, R. P., y J. B. Russell. 1997. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intakes. *J. Anim. Sci.* 75:224-229.
- Lanyon, L. E. 1992. Implications of dairy herd size for farm material transport, plant nutrient management, and water quality. *J. Dairy Sci.* 75:334-344.
- Lee, K. G., y T. Shibamoto. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chem.* 74:443-448.
- Leng, R. A. 1970. Formation and production of volatile fatty acids in the rumen. In: *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant* (ed. Phillipson, A. T.). Oriel Press, Newcastle upon Tyne, United Kingdom.
- Mahmoud, A. -L. E. 1994. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Lett. Appl. Microbiol.* 19:110-113.
- Martín, M. B. 2002. Principales aspectos legislativos de la ganadería y el medio ambiente. *Medioambiente. Nuestra Cabaña.* 315:62-70.
- Mazzuchelli, F., y A. Sánchez. 1999. Impacto ambiental de las explotaciones de vacuno lechero. *Vacuno de leche y contaminación. Bovis.* 89:15-25.
- McDonals, P., R. Edwards, y J. F. D. Greenhalgh. 1999. *Nutrición Animal* (5ª Ed.). Ed. Acribia, Zaragoza.
- McGuffey, R. K., L. F. Richardson, y J. I. D. Wilkinson. 2001. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. *J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):E194-E203.
- McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, y C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on rumen microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5011-5014.
- McSweeney, C. S., B. Palmer, R. Bunch, y D. O. Krause. 1999. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3075-3083.
- Meyer, D. 2000. Dairying and the environment. *J. Dairy Sci.* 83:1419-1427.
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA). 2002. *Censos y producciones ganaderas. Hechos y cifras del sector agroalimentario y del medio rural español* (6ª Ed.).
- Molero, R, M. Ibars, S. Calsamiglia, A. Ferret y R. Losa. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability

- in heifers fed diets with different forage to concentrate rations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:91-104.
- Morse, D., H. H. Head, C. J. Wilcox, H. H. Van Horn, C. D. Hissem, y B. Harris. 1992. Effects of concentration of dietary phosphorus on amount and route of excretion. *J. Dairy Sci.* 75:3039-3049.
- Naganawa, R., N. Iwata, K. Ishikawa, H. Fukuda, T. Fujino, y A. Suzuki. 1996. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur- containing compound derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4238-4242.
- Nakamura C. V., T. Ueda-Nakamura, E. Bando, A. F. N. Melo, D. A. G. Cortez, y B. P. D. Filho. 1999. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 94(5):675-678.
- National Research Council (NRC). 2001. Dairy Cattle Nutrition and the Environment. pp:244-248. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle (7th rev. Ed).* National Academy Press., Washington, DC.
- Nelson, R. R. S. 1997. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:305-306.
- Newbold, C. J., F. M. McIntosh, P. Williams, R. Losa, y R. J. Wallace. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:105-112.
- Nostro, A., A. R. Blanco, M. A. Cannatelli, V. Enea, G. Flalmini, I. Morelli, A. S. Roccaro, y V. Alonzo. 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230:191-195.
- Owen, J. B. 1994. Pollution in livestock production systems. En: *Pollution in Livestock production systems*, 1-15. I. Ap. Dewi, R. F. E. Axford, I. Fayed M. Marai, H. Omed, eds. CAB International. Wallington, UK.
- Paster, B. J., J. B. Russell, C. M. Yang, J. M. Chow, C. R. Woese, y R. Tanner. 1993. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *clostridium aminophilum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:107-110.
- Pont, J. M. 2002. Explotaciones en crecimiento; organizando el trabajo. VIII Congreso Internacional de Medicina Bovina, Anembe, Madrid, Diciembre 2002.

- Richardson, L. F., A. P. Raun, E. L. Potter, C. O. Cooley, y R. P. Rathmacher. 1976. Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. J. Anim. Sci. 43:657-664.
- Rompelberg, C. J. M., S. J. C. J. Evertz, G. C. D. M. Bruijntjesrozier, P. D. van den Heuvel, y H. Verhagen. 1996. Effect of eugenol on the genotoxicity of established mutagens in the liver. Food and Chemical Toxicology. 34:33-42.
- Russell, J. B., y R. B. Hespell. 1981. Microbial rumen fermentation. J. Dairy Sci. 64:1153-1169.
- Russell, J. B. 1987. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. J. Anim. Sci. 64:1519-1525.
- Russell, J. B., y H. J. Strobel. 1988. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. J. Anim. Sci. 66:552-558.
- Russell, J. B., y H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 55:1-6.
- Rychlik, J. L., y J. B. Russell. 2000. Mathematical estimations of hyper-ammonia producing ruminal bacteria and evidence for bacterial antagonism that decreases ruminal ammonia production. FEMS Microbiology Ecology. 32:121-128.
- Sánchez, A. 1999. Marco legal de los residuos ganaderos en España. Vacuno de leche y contaminación. Bovis. 89:27-35.
- Sikkema, J., J. A. M De Bont, y B. Poolman. 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59:201-222.
- Singh, B., M. B. Falahee, y M. R. Adams. 2001. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. Food Microbiol. 18:133-139.
- Sivropoulou, A., S. Kokkini, T. Lanaras, y M. Arsenakis. 1995. Antimicrobial Activity of Mint Essential Oils. J. Agric. Food Chem. 43:2384-2388.
- Sivropoulou, A., E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras, y M. Arsenakis. 1996. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. J. Agric. Food Chem. 44:1202-1205.
- Skandamis, P. N., y G.-J. E. Nychas. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. J. Appl. Microbiol. 91:1011-1022.

- Sliwinski, B. J., C. R. Soliva, A. Machmüller, y M. Kreuzer. 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101:101-114.
- Smith-Palmer, A., J. Stewart, y L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:118-122.
- Smith-Palmer, A., J. Stewart, y L. Fyfe. 2002. Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholine-specific production in *Listeria monocytogenes* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. *J. Med. Microbiol.* 51:567-574.
- Stern, M. D., G. A. Varga, J. H. Clark, J. L. Firkins, J. T. Huber, y D. L. Palmquist. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. Symposium: Metabolism relationships in supply of nutrients for milk protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 77:2762-2786.
- St-Pierre, N. R., y C. S. Thraen. 1999. Animal grouping strategies, sources of variation, and economic factors affecting nutrient balance on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl 2):72-83.
- Tamminga, S. 1992. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.* 75:345-357.
- Tamminga, S. 1996. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *J. Anim. Sci.* 74:3112-3124.
- Tamminga, S., y M. W. A. Verstegen. 1996. Implications of nutrition of animals on environmental pollution. En: Recent developments in ruminant nutrition 3, 213-228. P. C. Garnsworthy and D. J. A. Cole, eds. Nottingham University Press, UK.
- Thompson, D. P. 1986. Effect of essential oils on spore germination of *Rhizopus*, *Mucor* and *Aspergillus* species. *Mycologia.* 78:482-485.
- Uedo, N., M. Tatsuta, H. Iishi, M. Baba, N. Sakai, H. Yano, y T. Otani. 1999. Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Lett.* 137:131-136.
- Ultee, A., E. P. W. Kets, y E. J. Smid. 1999. Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65:4606-4610.

- Ultee, A., M. H. J. Bennik, y R. Moezelarr. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1561-1568.
- Valdez, F. R., L. J. Bush, A. L. Goetsch, y F. N. Owens. 1986. Effect of steroidal saponin on ruminal fermentation and on production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69:1568-1575.
- Van Bruchem, J., H. Schiere, y H. van Keulen. 1999. Dairy farming in the Netherlands in transition towards more efficient nutrient use. *Livest. Prod. Sci.* 61:145-153.
- Van der Hoek, K. W. 1998. Nitrogen efficiency in global animal production. *Environmental Pollution* 102 (S1):127-132.
- Van Horn, H. H., A. C. Wilkie, W. J. Powers, y R. A. Nordstedt. 1994. Components of dairy manure management systems. *J. Dairy Sci.* 77:2008-2030.
- Van Nevel, C. J., y D. I. Demeyer. 1977. Manipulation of rumen fermentation. En: *The Rumen Microbial Ecosystem*, 387-443. P. N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science, U. K.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, y B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583.
- Varel, V. H., y D. N. Miller. 2001. Plant-derived oils reduce pathogens and gaseous emissions from stored cattle waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1366-1370.
- Vázquez, B. I., C. Fente, C. M. Franco, M. J. Vázquez, y A. Cepeda. 2001. Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 67:157-163.
- Voda, K., B. Boh, M. Vrtacnik, y F. Pohleven. 2003. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora putana*. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 51:51-59.
- Walsh, S. E., J.-Y. Maillard, A. D. Russell, C. E. Catrenith, D. L. Charbonneau, y R. G. Bartolo. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on gram-positive and -negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94:240-247.
- Wallace, R. J., y M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. En: *The Rumen Microbial Ecosystem*, 217-249. P. N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science, U. K.

- Wallace, R. J., Laury Arthaud, y C. J. Newbold. 1994. Influence of *Yucca shidigera* extract on Ruminal Ammonia concentrations and ruminal Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1762-1767.
- Wallace, R. J. 1996. Ruminal microbial metabolism of peptides amino acids. Conference: Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization. *J. Nutr.* 126:1326S-1334S.
- Wang, Y., T. A. McAllister, C. J. Newbold, L. M. Rode, P. R. Cheeke, y K-J. Cheng. 1998. Effects of *Yucca shidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technilque (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 74:143-153.
- Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, y D. R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:122-134.
- Wilson, R. C., T. R. Overton, y J. H. Clark. 1998. Effects of *Yucca shidigera* extract and soluble protein on performance of cows and concentrations of urea nitrogen in plasma and milk. *J. Dairy Sci.* 81:1022-1027.
- Wu, Z., M. Sadik, F. T. Sleiman, J. M. Simas, M. Pessaraki, y J. T. Huber. 1994. Influence of Yucca Extract on Ruminal Metabolism in Cows. *J. Anim. Sci.* 72:1038-1042.
- Yang, C.-M. J., y J. B. Russell. 1993a. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3250-3254.
- Yang, C.-M. J., y J. B. Russell. 1993b. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation *in vivo* and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.* 71:3470-3476.
- Youdim, K. A., y S. G. Deans. 1999. Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mech. Ageing Dev.* 109:163-175.

CAPÍTULO 2

Efecto de una mezcla específica de compuestos de aceites esenciales y el tipo de ración sobre la fermentación microbiana ruminal y el flujo de nutrientes en un sistema de cultivo continuo

Effect of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system

Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system**Abstract**

Eight dual flow continuous culture fermenters (1,320 ml) were used in two replicated periods (8 d each) to study the effects of a specific blend of essential oil compounds (BEO, CRINA® RUMINANTS) on rumen microbial fermentation and nutrient flow. Temperature (39°C), pH (6.4), and liquid (0.10/h) and solid (0.05/h) dilution rates were maintained constant. Treatments were arranged in a 2 x 2 factorial design. Main factors were type of diet (i.e., 100 to 900 g/kg vs. 600 to 400 g/kg forage to concentrate ratios) and the addition of BEO (i.e., 0 vs. 1.5 mg/l of BEO). Diets (95 g/d of dry matter) were fed in three equal portions along the day. Each experimental period consisted of 5 d for adaptation of the rumen fluid to in vitro conditions and 3 d for sampling. Effluent samples were taken from a composite of the three sampling days, and bacteria were isolated from fermenter flasks on the last day of each period for chemical analysis. There were no significant interactions between diet type and the addition of BEO. There were no effects of diet type on dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and crude protein (CP) digestion. The high concentrate diet had a higher concentration of total volatile fatty acid (VFA; 128.1 vs. 110.9 mM), proportion of propionate (26.6 vs 20.5 %) and proportion of butyrate (18.5 vs. 13.9 %) compared with the high forage diet. The high forage diet had a higher proportion of acetate (61.0 vs. 50.3 %), acetate to propionate ratio (2.98 vs. 1.98), ammonia N concentration (8.64 vs. 3.01 mg/100ml), total N flow (3.57 vs. 3.26 g/d), ammonia N flow (0.27 vs. 0.10 g/d) and non-ammonia N flow (3.30 vs. 3.17 g/d) compared with the high concentrate diet. There were no effects of BEO on DM, OM, NDF, ADF and CP digestion. The use of BEO increased the concentration of total VFA (122.8 vs. 116.2 mM) without affecting individual VFA proportions or N metabolism. Further research is required to determine the effect of dose of BEO and adaptation time to the addition of BEO on N metabolism of rumen microorganisms.

Keywords: Essential oil, rumen microbial fermentation

Abbreviations: ADF, acid detergent fibre; BEO, blend of essential oil compounds; CP, crude protein; DM, dry matter; EMPS, efficiency of microbial protein synthesis; EU, European Union; HAP, ammonia hyperproducing; NDF, neutral detergent fibre; OM, organic matter; VFA, volatile fatty acid.

1. Introduction

Intensive animal production systems contribute to environmental problems through emission of ammonia and methane (Tamminga, 1992). Ruminants have a low efficiency of N retention, with 700 to 850 g/kg N ingested being excreted in feces and urine (Aarts et al., 1992). The European Union (EU) has developed directives to control the problem by establishing limits for the annual amount of N released to the environment (Nitrate Directive, 91/676/EU).

Tamminga (1992) suggested that controlling microbial degradation of dietary crude protein (CP) in the rumen could effectively reduce N losses and improve efficiency of N utilization. This could be accomplished by using low rumen degradable CP sources or by using feed additives that modify rumen microbial activity. Ionophores have been widely used to improve feed efficiency of beef cattle, but these additives interfere with N metabolism reducing amino acid deamination *in vitro* and *in vivo* (Richardson et al., 1976; Russell and Strobel, 1988) through the inhibition of ammonia hyperproducing (HAP) bacteria (Paster et al., 1993; Russell et al., 1988).

The forthcoming prohibition in EU of the use of antibiotics in animal feeds in 2005 (Regulation 1831/2003/EC) has intensified the search for alternative natural products that modulate ruminal fermentation. Essential oils are plant secondary metabolites responsible for odour and colour of plants and spices. These products exhibit antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria (Helander et al., 1998). Early studies suggested that essential oils have an antibacterial effect in the rumen of sheep and deer (Oh et al., 1967). Recently, Evans and Martins (2000) observed that thymol, a primary component of some essential oils, modified the concentration of volatile fatty acids (VFA) in *in vitro* incubations of ruminal fluid. In

addition, there is evidence that some essential oils reduce the rate of deamination of amino acids, rate of ammonia production and the number of HAP bacteria (McEwan et al., 2002a; Wallace et al., 2002; McIntosh et al., 2003). Therefore, natural plant extracts can be used to manipulate ruminal fermentation by selective modulation of certain microbial species.

The objective was to determine effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a dual flow continuous culture system. Specific objectives were to determine the effects of essential oils on rumen N and energy metabolism, and its interaction with diet type (i.e., a high forage diet vs. a high concentrate diet).

2. Materials and methods

Eight 1,320 ml dual flow continuous culture fermenters developed by Hoover et al. (1976) were used in two replicated periods. Each experimental period consisted of 5 d for adaptation of the ruminal fluid to the continuous culture system and 3 d for sampling.

Treatments were arranged in a 2 by 2 factorial design, the main factors being the type of diet (i.e., high concentrate diet vs. high forage diet) and addition of BEO (i.e., 0 vs. 5 mg/d).

2.1. Diets

Two diets, one typically fed to beef cattle in a barley-beef system (i.e., 100 to 900 g/kg straw to concentrate ratio), and one typically fed to dairy cattle (i.e., 600 to 400 g/kg alfalfa hay to concentrate ratio), were formulated to meet or exceed current nutrient recommendations for beef cattle (NRC, 1996) and lactating dairy cows (NRC, 2001), respectively (Table 1). Diets were fed (95 g/d of DM) in three equal portions at 0800, 1600 and 2400 h to the fermenters.

Table 1. Ingredient and chemical composition of dietary treatments

	Diet	
	High Concentrate	High Forage
Ingredient composition (g/kg DM)		
Alfalfa hay	-	603
Barley grain, ground	359	122
Corn grain, ground	344	172
Soybean meal, 44%	179	97
Barley straw	101	-
Limestone (CO ₃ Ca)	10	-
NaCl	4	3
NaH ₂ PO ₄	-	2
Vit -Min. Mix ¹	3	1
Chemical composition (g/kg DM)		
DM (g/kg)	897	896
OM	953	925
CP	153	180
NDF	202	302
ADF	94	217

¹ Vitamin and mineral mix contained per Kg DM: 7 mg Co; 167 mg Cu; 33 mg I; 2,660 mg Mn; 27 mg Se; 4,660 mg Zn; and 1,000 KIU of vitamin A, 200 KIU of vitamin D3, and 1,330 mg of vitamin E; 267 g of urea, 67 g of NaCl; 33 g of sulphur and 300 g of MgO.

2.2. Specific blend of essential oil compounds

The specific blend of essential oil compounds (BEO, Crina® for ruminants) is a patented commercial product from AKZO NOBEL/CRINA S.A (Gland, Switzerland; European patent N°. 630,577). The main components of this BEO are thymol, limonene and guaiacol. Thymol (*5-methyl-2-isopropylphenol*) is a major essential oil component of thyme (*Thymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*). Limonene (1-methyl-4-(1-methylethenyl) cyclohexene) is the most abundant monocyclic monoterpene in citrus

peel oil. Guaiacol (2-methoxyphenol) is a yellowish oily liquid extracted from guaiacum resin and a component of clove oil.

The recommended dose of BEO for an adult cow of 650 kg of BW is 650 to 1,300 mg/d. At an average intake of 20 kg DM/d, the corresponding intake for the 95 g of diet fed to fermenters is 3.3 to 6.5 mg BEO/d. The dose of BEO in the present experiment was 5 mg/d/fermenter, equivalent to a final concentration in the fermenter fluid of 1.5 mg/l, and was incorporated directly to the diets.

2.3. Continuous culture operating conditions

On the first day of each period, fermenters were inoculated with undiluted ruminal fluid taken from a cow fed a 600 to 400 g/kg forage to concentrate ratio diet. Fermentation conditions were maintained constant with a temperature of 39°C, and pH at 6.4 ± 0.05 by infusion of 3 N HCl or 5 N NaOH, and monitored and controlled by a computer and a Programmable Linear Controller (FieldPoint, National Instruments, Austin, TX, USA). Anaerobic conditions were maintained by infusion of N₂ gas at a rate of 40 ml/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into flasks and contained 0.4 g/l of urea to simulate recycled N. Infusion of saliva and flows of filtered liquid were set to maintain a liquid and solid dilution rates at 0.10 and 0.05/h, respectively.

2.4. Sample collection and processing

During sampling days, collection vessels were maintained at 4°C to prevent microbial activity. Solid and liquid effluents were mixed and homogenized for 1 min, and a 600 ml sample was removed by aspiration. Upon completion of each period, effluents from the three sampling days were composited and mixed within fermenter, and homogenized for 1 min. Subsamples were taken for total N, ammonia N, and VFA analyses. The remainder of the sample was lyophilized. Dry samples were analyzed for dry matter (DM), ash, neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF), and purine contents.

Bacterial cells were obtained from fermenter flasks on the last day of each experimental period. Solid and liquid associated bacteria were isolated using a combination of several detachment procedures (Whitehouse et al., 1994) selected to obtain the maximum detachment without affecting cell integrity. One hundred milliliters of a 2 g/l methylcellulose solution and small marbles (30 of 2 mm and 15 of 4 mm of diameter) were added to each fermenter and incubated in the same fermenter flasks at 39°C and mixed for 1 h to remove attached bacteria. After incubation, fermenter flasks were refrigerated for 24 h at 4°C. After this incubation, fermenter contents were agitated for 1 h to dislodge loosely attached bacteria. Finally, the fermenter content was filtered through cheesecloth and washed with saline solution (8.5 g/l NaCl). Bacterial cells were isolated within 4 h by differential centrifugation at 1,000 x g for 10 min to separate feed particles, and the supernatant was centrifuged at 20,000 x g for 20 min to isolate bacterial cells. Pellets were rinsed twice with saline solution and recentrifuged at 20,000 x g for 20 min. The last rinse was done with distilled water to prevent contamination of bacteria with ash. Bacterial cells were lyophilized and analyzed for DM, ash, N, and purine contents. Digestion of DM, OM, NDF, ADF and CP, and flows of total, non-ammonia, microbial, and dietary N were calculated as described by Stern and Hoover (1990).

2.5. Chemical analyses

Effluent DM was determined by lyophilizing 200 ml aliquots in triplicate with subsequent drying at 103°C in a forced air oven for 24 h. The DM content of diets and bacterial samples was determined by drying samples for 24 h in a 103°C forced air oven (AOAC, 1990; ID 950.01). Dry samples of diets, effluents and bacteria were ashed overnight at 550°C in a muffle furnace (AOAC, 1990; ID 942.05), and OM was determined by difference. Fibre components of diets and effluents were analyzed sequentially (Van Soest et al., 1991) using a thermostable alpha-amylase and sodium sulfite, and expressed without residual ash. Total N of diets, effluents and bacterial samples was determined by a Kjeldhal method (AOAC, 1990; ID 976.05). Effluent CP was determined in liquid samples. Ammonia N was analyzed by colorimetry as described by Chaney and Marbach (1962), where 4 ml of a 0.2 N HCl solution were added to 4 ml of filtered rumen fluid and frozen. Samples were centrifuged at 25,000 x g for 20 min, and the supernatant was used to determine ammonia N. Samples for VFA

analysis were prepared as described by Jouany (1982) and analyzed by gas chromatography: 1 ml of a solution made up of a 2 g/l solution of mercuric chloride, 2 g/l of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 20 g/l orthophosphoric acid, was added to 4 ml of filtered rumen fluid and frozen. Samples were centrifuged at 3,000 x g for 30 min, and the supernatant analyzed by gas chromatography (Model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) using a polyethylene glycol TPA treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Bucinghamshire, UK). Samples of lyophilized effluent and bacterial cells were analyzed for purine content (adenine and guanine) by HPLC as described Balcells et al. (1992), using allopurinol as the internal standard.

2.6. Statistical Analyses

Results were analyzed as completely randomized block designs with a 2 x 2 factorial arrangement of treatments, the main factors being the type of diet (i.e., high concentrate diet vs. high forage diet) and the addition of BEO (i.e., 0 vs. 5 mg/d). Main effects and their interactions were determined with the analysis of variance using the General Linear Model procedure of SAS (1989). Differences between means were tested using the Tukey's multiple comparison test and declared at $P < 0.05$.

Table 2. Effect the type of diet and the addition of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on true dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) digestion in continuous culture

	Treatments				SEM ⁴	P < ³	
	Diet ¹		BEO ²			Diet	BEO
	HC	HF	CTR	BEO			
True digestibility, g/kg							
DM	600	591	600	591	12.5	NS	NS
OM	602	581	586	596	9.1	NS	NS
NDF digestibility, g/kg	422	389	408	403	24.3	NS	NS
ADF digestibility, g/kg	465	468	468	465	32.6	NS	NS

¹HC = High Concentrate Diet; HF = High Forage Diet.

²CTR = Without BEO; BEO = With BEO (1.5 mg/l).

³NS: $P > 0.05$.

⁴SEM: standard error of the mean.

3. Results

There were no significant interactions between the type of diet and the addition of the BEO, and so results are presented by main effects in Tables 2, 3 and 4.

3.1. Effects of diet

Dry and organic matter truly digested (average of 596 and 591 g/kg, respectively), and NDF and ADF digestion (average of 406 and 467 g/kg, respectively) were within expected ranges and not affected by type of diet (Table 2).

Table 3. Effect the type of diet and the addition of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on total volatile fatty acid (VFA) concentration and profile in continuous culture

	Treatments				SEM ⁴	P < ³	
	Diet ¹		BEO ²			Diet	BEO
	HC	HF	CTR	BEO			
Total VFA, mM	128.1	110.9	116.2	122.8	1.67	***	*
VFA, mol/100 mol							
Acetate	50.3	61.0	53.8	57.6	1.97	**	NS
Propionate	26.6	20.5	24.1	22.9	1.45	*	NS
Butyrate	18.5	13.9	17.4	15.0	1.19	*	NS
Iso-Butyrate	0.65	0.60	0.61	0.64	0.06	NS	NS
Valerate	2.71	3.02	2.99	2.74	0.18	NS	NS
Iso-Valerate	1.24	1.00	1.11	1.13	0.18	NS	NS
BCVFA ⁵ , mM	2.4	1.78	2.01	2.18	0.31	NS	NS
Acetate:Propionate	1.98	2.98	2.36	2.60	0.17	**	NS

¹HC = High Concentrate Diet; HF = High Forage Diet.

²CTR = Without BEO; BEO = With BEO (1.5 mg/l).

³Differences between means are significant: NS = P > 0.05; * P < 0.05; ** P < 0.01;

*** P < 0.001.

⁴SEM: standard error of the mean.

⁵BCVFA: Branch-chained VFA.

Fermenters fed the high concentrate diet resulted in higher concentrations of VFA and higher proportions of propionate and butyrate than the high forage diet (Table 3). In contrast, the high forage diet had a higher proportion of acetate and acetate to propionate ratio than the high concentrate diet.

Table 4. Effect the type of diet and the addition of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on N metabolism of ruminal microorganisms in continuous culture

	Treatments				SEM ⁴	P < ³	
	Diet ¹		BEO ²			Diet	BEO
	HC	HF	CTR	BEO			
N-NH ₃ , mg/100 ml	3.01	8.64	5.44	6.21	0.47	***	NS
N Flow, g/d							
Total	3.26	3.57	3.43	3.41	0.03	***	NS
Ammonia	0.10	0.27	0.17	0.20	0.01	***	NS
Non-Ammonia	3.17	3.30	3.26	3.21	0.03	*	NS
Bacterial	1.53	1.71	1.56	1.68	0.09	NS	NS
Dietary	1.64	1.60	1.70	1.53	0.11	NS	NS
CP Degradation, g/kg	310	426	335	401	43.8	†	NS
EMPS ⁵	25.3	29.8	26.8	28.2	1.21	*	NS

¹HC = High Concentrate Diet; HF = High Forage Diet.

²CTR = Without BEO; BEO = With BEO (1.5 mg/l).

³Differences between means are significant: NS = P > 0.05; † P < 0.10; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

⁴SEM: standard error of the mean.

⁵EMPS: Efficiency of microbial protein synthesis (g bacterial N/kg organic matter truly digested).

The effects of type of diet on N metabolism of rumen microbes in continuous culture are presented in Table 4. Ammonia N concentration, and the flow of total, ammonia and nonammonia N were higher in the high forage diet, which was expected due to the higher total CP content of this diet. There was also a trend (P < 0.09) for the degradation of CP to be higher in the high forage diet. There were no effects of type of diet on bacterial and dietary N flows. However, the efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) was higher in the high forage diet.

3.2. Effects of the BEO

Dry and organic matter truly digested, and NDF and ADF digestion were not affected by the addition of the BEO (Table 2). Fermenters supplemented with the BEO resulted in higher total VFA concentrations without affecting the proportion of individual VFA (Table 3). The addition of BEO did not affect ammonia N concentration, the flow of total, ammonia, nonammonia, bacterial and dietary N, the degradation of crude protein, and EMPS of rumen bacteria in continuous culture (Table 4).

4. Discussion

4.1. Effects of diet

Dry and organic matter, and fibre digestibility were within expected ranges and similar between diets. Similar results have been observed in diets with low and high fibre content (Devant et al., 2001; Calsamiglia et al., 2002) using this in vitro system at constant pH. Merchen et al. (1986) observed that OM truly digested was higher when sheep were fed a low forage diet (200 g/kg NDF) than when they were fed a high forage diet (420 g/kg NDF). In contrast, in other experiments in vivo, DM and OM digestion were not different in low (250 g/kg NDF) versus high (390 g/kg NDF) fibre diets (Kinser et al., 1988). However, Merchen et al. (1986) and Kinser et al. (1988) reported that digestibility of NDF was higher in a high fibre diet than in a low fibre diet. Low fibre digestion in ruminants consuming high concentrate diets is a consequence of either the type of substrate being fermented or the resulting low ruminal pH for microbial fibre degradation. Russell (1998) reported that the substrate was responsible for 75% of the changes observed on microbial fermentation, and only 25% of the changes could be explained by the change in pH. Because substrate in the present trial was very different (i.e., high concentrate vs. high forage diets), a decrease in NDF digestibility in the high concentrate diet would be expected compared to the high forage diet, but differences were not significant. It is reasonable to hypothesize that organic matter and fibre digestibility did not decrease in the present trial because pH was maintained constant, but results may have been different if pH would have been lower as a result of feeding a high concentrate diet. The direct effect of pH on fibre digestion is unquestionable.

Calsamiglia et al. (2002) observed that fibre digestion was lower at low pH (5.7) compared with high pH (6.4) when fermenters were fed the same diet. Therefore, controlled pH in the present trial may have prevented the reduction of fibre digestion in the high concentrate diet.

The high concentrate diet increased total VFA concentration and the proportions of propionate and butyrate, and the high forage diet increased the proportion of acetate and the acetate to propionate ratio. These results agree with other *in vivo* (Merchen et al., 1986; Kinser et al., 1988) and *in vitro* (Russell, 1998) reports, where the net production of VFA was highly correlated with the composition of the diet.

In the present trial, the high forage diet increased EMPS. *In vitro*, a higher EMPS with the high forage diets compared with high concentrate diets has been reported previously. Meng et al. (1999) observed in continuous culture that diets with high fibre content (524 g/kg NDF) resulted in higher EMPS compared with low fibre diets (96 g/kg NDF). In contrast, Kinser et al. (1988) studied the EMPS *in vivo* and did not observe differences between a high forage (390 g/kg NDF) and a low forage (250 g/kg NDF) diet. The numerical decrease in OM digestibility and the numerical increase in bacterial N flow observed in the high forage diet resulted in a higher EMPS in this diet.

In general, the effects of diet type on rumen microbial fermentation profile and nutrient flow were expected and agree with the reports that compared high forage (600 to 400 forage to concentrate) with high concentrate (100 to 900 forage to concentrate) diets.

4.2. Effects of the BEO

The addition of BEO increased total VFA concentration without affecting the proportion of individual VFA. Differences in total VFA concentration suggest that nutrient digestion was improved and supports the numerical difference observed in true OM digestibility. Newbold et al. (2004) observed that total VFA concentration tended to be higher at 6 h after feeding in sheep supplemented with 110 mg/d of BEO. However, Wallace et al. (2002) supplemented ruminally fistulated sheep with 100 mg/d of the same BEO and did not observe effects on total VFA concentrations. Evans and Martin (2000) observed that thymol, a major essential oil component of this BEO,

reduced the total concentration of VFA in in vitro 24 h incubations of mixed ruminal fluid, but the dose (400 µg/ml of thymol) was much higher than that used in the present trial, where BEO was supplied to fermenters to reach a concentration of 1.5 µg/ml.

In vivo and in vitro trials reported that monensin supplementation maintained (Russell and Strobel, 1988; Yang and Russell, 1993) or increased (Richardson et al., 1976; Lana and Russell, 1997) total VFA concentration regardless of the type of diet. However, a constant observation of the addition of monensin is an increase in propionate and a decrease acetate and butyrate proportions in ruminal fluid (Richardson et al., 1976; Russell and Strobel, 1988; Yang and Russell, 1993). Although, the increase in total VFA in the present trial was similar to that observed for monensin, the lack of changes in the VFA profile suggests that the mechanism of action may not be the same. In fact, monensin affects only some gram-positive bacteria, and essential oils may inhibit some gram-positive and gram-negative bacteria (Helander et al., 1998), and may explain the different effects on microbial fermentation profile.

The addition of BEO did not modify N metabolism of rumen bacteria in continuous culture. Results agree with Wallace et al. (2002) and McIntosh et al. (2000), who observed that BEO did not affect the flow of microbial protein from the rumen. There were no effects of BEO on protein degradation (Table 4). In contrast, in in situ studies, the addition of BEO resulted in a decrease in the effective degradability and the rate of ruminal degradation of some, but not all, protein supplements tested (Newbold et al., 1999; Molero et al., 2004). McIntosh et al. (2000) observed that essential oils inhibited ruminal degradation of soyabean meal protein. McEwan et al. (2002b) observed a decrease in the ruminal degradation of peas and rapeseed meal proteins, and Wallace et al. (2002) observed a significant reduction in protein degradation of green peas meal, the most rapidly degraded protein meal, but had no effect on soyabean meal protein. The decrease in degradability was associated with a decrease in the attachment and colonization of these feeds by proteolytic microbes, and this effect was diet dependent. Wallace et al. (2002) observed that BEO reduced protein degradation in animals receiving a low protein diet, but not when animals received a high protein diet. Molero et al. (2004) also observed that ruminal CP degradation of lupin seed, green peas and sunflower meal was lower in heifers fed a high concentrate diet (150 g/kg forage) compared with those fed a high forage diet (750 g/kg forage). However, in the present

trial there was no interaction between the addition of BEO and the type of diet fed to fermenters.

Protein degradation is a complex process that includes proteolysis, peptidolysis and deamination. The studies discussed previously demonstrated that proteolysis was not greatly affected by the addition of BEO. However, in vitro 24 h incubation trials with ruminal fluid of sheep receiving BEO demonstrated that the breakdown of amino acids to ammonia was inhibited without affecting the proteolytic or peptidolytic activity (Newbold et al., 1999; Wallace et al., 2002; McIntosh et al., 2003). McIntosh et al. (2000) observed that essential oils inhibited deamination of amino acids by 25%. Wallace et al. (2002) and McIntosh et al. (2003) observed that the addition of monensin in an in vitro 24 h incubation system resulted in a decrease in the deaminative activity of ruminal fluid that was larger than that resulting from the addition of BEO. However, the combination of monensin and the BEO did not result in a larger decrease in the deamination activity, suggesting that the microbial species affected by the essential oils were the same as those affected by monensin (Wallace et al., 2002; McIntosh et al., 2003). This decrease in ammonia production was associated with a reduction in the number and diversity of a specific group of bacteria called hyper ammonia producing (HAP) bacteria (McEwan et al., 2002a). McIntosh et al. (2003) observed that BEO inhibited some HAP bacteria (*Clostridium sticklandii* and *Peptostreptococcus anaerobius*) while others (i.e., *Clostridium aminophilum*) were not affected. For this reason, the addition of BEO resulted in a smaller reduction in ammonia production than monensin. McEwan et al. (2002a) observed that the addition of BEO resulted in a reduction in the number of HAP bacteria only when sheep received a low protein concentrate, but not when they received a high protein concentrate. These results agree with Wallace et al. (2002), who also observed a 77% reduction in the numbers of HAP bacteria in sheep receiving BEO in a low protein diet, but not when sheep received BEO in a high protein diet. Again, the effect of BEO on rumen microbial fermentation was diet dependent. However, the total viable counts of bacteria were never affected by essential oils (Wallace et al., 2002). These results confirm that the effects of essential oils on rumen microbial fermentation were, at least in part, on amino acid degradation, and that these effects were apparently mediated by its effects on HAP. However, ammonia N concentration in the present trial was not affected by BEO.

The moderate, but quantitatively important, increase in the total VFA production observed in this trial due to BEO, together with no negative effects on nutrient digestibility, microbial fermentation profile or efficiency of microbial protein synthesis, should be considered of interest. However, the lack of effect of the BEO on N metabolism was unexpected, and could be attributed to one or several factors, including:

- a) Previous studies with the same BEO observed effects on N metabolism reducing the number of HAP bacteria (McEwan et al., 2002a; Wallace et al., 2002; McIntosh et al., 2003). Perhaps the rumen fluid in the dual flow continuous culture has a lower HAP bacteria population and, for this reason, its effects on deamination could not be observed.
- b) With the exception of a cattle experiment (McIntosh et al., 2003), most experiments that observed effects of BEO on N metabolism used fistuled sheep or sheep rumen fluid (Newbold et al., 1999; McIntosh et al., 2000; McEwan et al., 2002 a,b; Wallace et al., 2002). Attwood et al. (1998) reported that the sheep rumen fluid has higher number of HAP bacteria (11.6%) than the cow rumen fluid (5.2%). Perhaps the cow rumen fluid with less concentration of HAP bacteria used in the present trial may explain the lack of effect of BEO on N metabolism.
- c) The effects of essential oils on rumen microbial fermentation may be mediated through the protozoa population. The most obvious difference in microbial ecology between the in vivo rumen environment and the in vitro continuous culture is the drastic reduction in protozoa numbers (Hoover et al., 1976). However, McIntosh et al. (2000) and Wallace et al. (2002) demonstrated that the addition of BEO did not affect protozoal numbers or their activity in the rumen, suggesting that the effects were limited to the bacterial population.
- d) The dose of BEO used may have not been adequate in the in vitro conditions used in the present experiment. The BEO dose was calculated according to the amount of diet DM fed per fermenter, and most of the in vitro experiments conducted with this BEO, the dose was calculated according to the rumen volume. The average dose of BEO used in other trials resulted in a BEO concentration of 7 µg/ml rumen fluid (Newbold et al., 1999; McIntosh et al., 2000; McEwan et al., 2002 a,b; Wallace et al., 2002) and in the present study the average BEO concentration was 1.5 µg/ml rumen fluid. Therefore, the dose used in this trial was five times lower than the average dose used in other trials. Perhaps this difference may explain the lack of effect of this BEO on N metabolism.

- e) Some authors suggested that adaptation period of the rumen fluid to the addition of BEO could be important. Molero et al. (2004) observed that the reduction in protein degradation of soybean meal and sunflower meal was significant only after 28 d of adaptation to BEO. Wallace et al. (2003) suggested that the effect of BEO on rumen microbial fermentation was the result of an acute effect on deamination and an adaptative effect on proteolytic and peptidolytic activities. If this hypothesis is true, a longer adaptation time may be required to observe changes in N metabolism. It is possible that we did not observe effects on N metabolism because of the short experimental period of this *in vitro* system.

Considering these hypotheses, further research is required to confirm the optimal dose and the effect of time of adaptation of BEO on N metabolism of rumen microorganisms.

5. Conclusions

The high forage diet had a higher proportion of acetate, acetate to propionate ratio, ammonia N concentration, total and ammonia N flow, and efficiency of microbial protein synthesis than the high concentrate diet. The high concentrate diet had a higher concentration of total VFA and proportions of propionate and butyrate compared with the high forage diet. There were no interactions between the addition of the BEO and the type of diet. The BEO increased the concentration of total VFA without affecting other fermentation parameters, suggesting that diet fermentability was improved in dairy and beef diets. Further research is required to determine the optimal dose and the time of adaptation to essential oils required to observe effects on rumen N metabolism.

Acknowledgements

Research supported by the Project FEDER 2FD1997-2262 and AKZO NOBEL/CRINA S.A.

6. References

- Aarts, H. F. M., Biewinga, E. E., Van Keuleln, H., 1992. Dairy farming systems based on efficient nutrient management. *Neth. J. Agric. Sci.* 40, 285-299.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis (15th Ed)*. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Attwood, G. T., Klieve, A. V., Ouwerkerk, D., Patel, B. K. C., 1998. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1796-1804.
- Balcells, J., Guada, J. A., Peiró, J. M, Parker, D. S., 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Cromatogr.* 575, 153-157.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Devant, M., 2002. Effect of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85, 574-579.
- Chaney, A. L., Marbach, E. P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8, 130-132.
- Devant, M., Ferret, A., Calsamiglia, S., Casals, R., Gasa, J., 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *J. Anim. Sci.* 2001. 79, 1944-1953.
- Evans, J. D., Martin, S. A., 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.* 41, 336-340.
- Helander, I. M., Alakomi, H-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590-3595.
- Hoover, W. H., Crooker, B. A., Sniffen, C. J., 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43, 528-534.
- Jouany, J. P., 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliments.* 2, 131-144.
- Kinser, A. R., Fahey, G. C., Berger, L. L., Merchen, N. R., 1988. Low-quality roughages in high-concentrate pelleted diets for sheep: digestion and metabolism

- of nitrogen and energy as affected by dietary fibre concentration. *J. Anim. Sci.* 66, 487-500.
- Lana, R. P., Russell, J. B., 1997. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intakes. *J. Anim. Sci.* 75, 224-229.
- McEwan, N. R., Graham, R. C., Wallace, R. J., Losa, R., Williams, P., Newbold, C. J., 2002a. Effect of essential oils on ammonia production by rumen microbes. *Reprod. Nutr. Dev.* 42(Suppl.1), S65(abstract).
- McEwan, N. R., Graham, R. C., Wallace, R. J., Losa, R., Williams, P., Newbold, C. J., 2002b. Effect of essential oils on protein digestion in the rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 42(Suppl.1), S65-S66(abstract).
- McIntosh, F. M., Newbold, C. J., Losa, R., Williams, P., Wallace, R. J., 2000. Effects of essential oils on rumen fermentation. *Reprod. Nutr. Dev.* 40(Suppl.2), 221-222 (abstract).
- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beaver, D. A., Newbold, C. J., 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5011-5014.
- Meng, Q., Kerley, M. S., Ludden, P. A., Belyea, R. L., 1999. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 77, 206-214.
- Merchen, N. R., Firkins, J. L., Berger, L. L., 1986. Effect of intake and forage level on ruminal turnover rates, bacterial protein synthesis and duodenal amino acid flows in sheep. *J. Anim. Sci.* 62, 216-225.
- Molero, R., Ibars, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R., 2004. Effect of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate rations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 91-104.
- National Research Council, 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle* (7th rev. Ed). National Academy Press., Washington, DC.
- National Research Council, 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (7th rev. Ed). National Academy Press., Washington, DC.
- Newbold, C. J., McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 114, 105-112.

- Newbold, C. J., McIntosh, F. M., Wallace, R. J., Williams, P., Sutton, J. D., 1999. VIIIth International symposium on protein metabolism and nutrition, Aberdeen, UK, 52.
- Oh, H. K., Sakai, T., Jones, M. B., Longhurst, W. M., 1967. Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Appl. Microbiol.* 15, 777-784.
- Paster, B. J., Russell, J. B., Yang, C. M., Chow, J. M., Woese, C. R., Tanner, R., 1993. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 107-110.
- Richardson, L. F., Raun, A. P., Potter, E. L., Cooley, C. O., Rathmacher, R. P., 1976. Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* 43, 657-664.
- Russell, J. B., Strobel, H. J., Chen, G., 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Appl. and Environ. Microbiol.* 54, 872-877.
- Russell, J. B., Strobel, H. J., 1988. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. *J. Anim. Sci.* 66, 552-558.
- Russell, J. B., 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. *J. Dairy Sci.* 81, 3222-3230.
- Statistical Analysis Systems (SAS) Institute, 1989. *SAS User's Guide*. SAS Institute, Cary, NC.
- Stern, M. D., Hoover, W. H., 1990. The dual flow continuous culture system. In: *Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or fermentation*, pp 17-32. Northeast ADSA-ASAS Regional meeting, Chazy, NY.
- Tamminga, S., 1992. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.* 75, 345-357.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583.
- Wallace, R. J., McEwan, N. R., McIntosh, F. M., Teferedegne, B., Newbold, C. J., 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 10, 1458-1468.

- Wallace, R. J., McEwan, N. R., McIntosh, F. M., Newbold, C. J., 2003. Natural products for manipulation of fermentation in ruminants. In: Proc. 50th Maryland Nutr. Conf., 116-125.
- Weller, R. A., Pilgrim, A. F., 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32, 341-352.
- Whitehouse, N. L., Olson, V. M., Schwab, C. G., Chesbro, W. R., Cunningham, K. D., Lycos, K. D., 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72, 1335-1343.
- Yang, C.-M. J., Russell, J. B., 1993. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.* 71, 3470-3476.

CAPÍTULO 3

Efecto de la dosis y el tiempo de adaptación de una mezcla específica de compuestos de aceites esenciales sobre el metabolismo nitrogenado ruminal y el perfil de fermentación
in vitro e in vivo

**Effect of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on
rumen nitrogen metabolism and fermentation profile in vitro and in vivo**

Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen nitrogen metabolism and fermentation profile in vitro and in vivo**Abstract**

Eight dual flow continuous culture fermenters (1320 ml) were used in two periods (6 d of adaptation and 3 d of sampling) to study the effects of increasing doses of a specific blend of essential oils (BEO, CRINA® RUMINANTS) on rumen microbial fermentation. Fermenters were fed 95 g DM/d of a 600 g/kg forage and 400 g/kg concentrate diet (180 g/kg CP; 302 g/kg NDF) three times per day. Treatments were: CTR (no BEO), D5 (5 mg/l of BEO), D50 (50 mg/l of BEO) and D500 (500 mg/l of BEO), and were randomly assigned to fermenters within periods. During the last 3 days, samples were taken at 0, 2, 4 and 6 h after the morning feeding and analyzed for large peptide (LPep), small peptides plus amino acid (SPep+AA) and ammonia N concentrations, and volatile fatty acids (VFA) profile at 2 h. The D5 increased total VFA concentration, the proportion of acetate and the acetate to propionate ratio, and decreased the proportion of propionate and valerate, compared with CTR. The concentration of LPep N tended ($P = 0.08$) to be lower for D5 compared with CTR. The concentration of SPep+AA and ammonia N was similar across treatments. In the second experiment, eight sheep (average body weight of 57 kg) were used to study the effects of long term adaptation of rumen fluid to BEO on ruminal fermentation. Animals received 1.3 kg of a 500 g/kg forage and 500 g/kg concentrate diet (157 g/kg CP; 384 g/kg NDF). Four sheep were assigned at random to the CTR treatment (no BEO) and four sheep were adapted to BEO (110 mg/d of BEO) for four weeks (ADBEO). After four weeks samples of ruminal fluid were obtained at 0 and 3 h after the morning feeding and in two consecutive days using an oro-ruminal probe. Samples were analyzed for LPep, SPep+AA and ammonia N concentrations, total and individual VFA, and pH. Treatment ADBEO had no effect on N metabolism and pH, but tended ($P < 0.10$) to increase the proportion of acetate and decrease the proportion of valerate, compared with CTR. Ruminal fluid collected from each of CTR and ADBEO sheep was used to study in vitro fermentation profile of soybean meal, corn meal, alfalfa hay and

ryegrass hay. Treatments were: Control fluid (CTR without BEO), CTR fluid plus a single dose of BEO (11 mg/l; CTR+BEO) and ADBEO fluid plus a single dose of BEO (11 mg/l; ADBEO+BEO). The proportion of acetate and acetate to propionate ratio was higher, and the proportion of propionate and isovalerate, and BCVFA and ammonia N concentration were lower in ADBEO+BEO fluid compared with CTR fluid. However, treatment CTR+BEO had no effect on ammonia N concentration and VFA profile compared with CTR. The addition of 5 mg BEO/l of rumen fluid in continuous culture increased total VFA concentration and acetate to propionate ratio after 6 days of fermentation, but changes in N metabolism were only apparent when using ruminal fluid from sheep fed BEO for 28 days.

Keywords: Essential oil, rumen fermentation, N metabolism.

Abbreviations: ADBEO, rumen fluid from adapted sheep; ADBEO+BEO, rumen fluid from adapted sheep plus a single dose of BEO; ADF, acid detergent fibre; BCVFA, branch-chained volatile fatty acid; BEO, blend of essential oil compounds; CP, crude protein; CTR, control treatment and rumen fluid from control sheep; CTR+BEO, rumen fluid from control sheep plus a single dose of BEO; DM, dry matter; EMPS, efficiency of microbial protein synthesis; NDF, neutral detergent fibre; LPep, large peptide; SPep+AA, small peptide plus amino acid; OM, organic matter; VFA, volatile fatty acid.

1. Introduction

Spices and herbs have been used worldwide for their antimicrobial activity since antiquity (Hoffmann and Evans, 1911). Essential oils are aromatic oily liquids obtained from plants, that can be used as natural additives in animal feeds because of their antibacterial, antifungal, and antioxidant properties. These essential oils are potential natural alternatives to the use of antibiotics as growth promoters in animal feeds that will be prohibited in the European Union in 2006 (Regulation 1831/2003/EC).

Previous studies (McIntosh et al., 2003; Molero et al., 2004; Newbold et al., 2004) reported that a specific blend of essential oil compounds (BEO), which major components are thymol, guaiacol and limonene, modified rumen N metabolism. In contrast, Castillejos et al. (2005) observed that the addition of BEO to two different diets (high forage and high concentrate) in a continuous culture fermentation system

during 8 d increased total VFA concentration but had no effect on N metabolism. However, Castillejos et al. (2005) used a dose of BEO that was five times lower and an adaptation time that was four times shorter compared with previous studies (McIntosh et al., 2003; Molero et al., 2004; Newbold et al., 2004). Some of these studies suggested that at least 28 days adaptation period of rumen microbial population may be required to observe the effects of BEO (Wallace et al., 2003; Molero et al., 2004). Therefore, the lack of effect of BEO on N metabolism in Castillejos et al. (2005) was attributed to the low dose of BEO used (1.5 mg/l) and to the short adaptation period of the microbial population (8 d). The objectives of the present study were to evaluate the effects of three different doses and different adaptation times of BEO on rumen microbial fermentation.

2. Materials and methods

2.1. Experiment 1

2.1.1. *Fermenters, Diet and Treatments*

Eight 1,320 ml dual flow continuous culture fermenters developed by Hoover et al. (1976) were used in two replicated periods. Each experimental period consisted of 6 d for adaptation of the ruminal fluid to BEO and 3 d for sampling.

All fermenters were fed 95 g/d of DM of a diet formulated to meet or exceed current nutrient recommendations for lactating dairy cows (180 g/kg CP, 302 g/kg NDF, 217 g/kg ADF; NRC, 2001) and was fed in three equal portions at 0800, 1600 and 2400 h. The diet (DM basis) consisted of alfalfa hay (603 g/kg), ground corn grain (172 g/kg), ground barley grain (122 g/kg), soybean meal (97 g/kg) and a vitamin and mineral mixture (6 g/kg). The vitamin and mineral mixture contained per kg of DM: 7 mg Co; 167 mg Cu; 33 mg I; 2,660 mg Mn; 27 mg Se; 4,660 mg Zn; and 1,000 KIU of vitamin A, 200 KIU of vitamin D₃, and 1,330 mg of vitamin E; 267 g of urea, 67 g of NaCl; 33 g of sulphur and 300 g of MgO.

The additive (BEO), Crina® for ruminants, is a patented commercial product from AKZO NOBEL/CRINA S.A (Gland, Switzerland; European patent N°. 630,577). The main components of this BEO are thymol, limonene and guaiacol. The recommended

dose of BEO for an adult cow of 650 kg of BW is 650 mg/d. Considering a rumen volumen of 40 l (rumen volum = $BW^{0.57}$, Owens and Goetsch, 1988) and a dilution rate of 10%/h, the estimated rumen fluid flow through the rumen is around 96 l/d. Therefore, the estimated rumen concentration of BEO was approximately 6.8 mg/l. Four different doses of BEO were used in the present experiment and were incorporated directly to the diet. Treatments were: Control (without BEO), D5 (5 mg/l of BEO), D50 (50 mg/l of BEO) and D500 (500 mg/l of BEO).

On the first day of each period, fermenters were inoculated with undiluted ruminal fluid taken from a cow fed a 600 g/kg forage and 400 g/kg concentrate diet. Fermentation conditions were maintained constant with a temperature of 39°C, and pH at 6.4 ± 0.05 by infusion of 3 N HCl or 5 N NaOH, and monitored and controlled by a computer and a Programmable Linear Controller (FieldPoint, National Instruments, TX). Anaerobic conditions were maintained by the infusion of N₂ gas at a rate of 40 ml/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into flasks and contained 0.4 g/l of urea to simulate recycled N. Infusion of saliva and flows of filtered liquid were set to maintain a liquid and solid dilution rates at 0.10 and 0.05 h⁻¹, respectively.

2.1.2. Sample Collection

On adaptation days, 8 ml of filtered fermenter fluid were taken 2 h after the morning feeding to determine ammonia N and VFA concentrations. During the last three days, 4 ml of filtered fermenter fluid were taken at 2 h after the morning feeding to determine VFA concentration, and 36 ml were also taken at 0, 2, 4 and 6 h after the morning feeding to determine trichloroacetic acid soluble N (TCA N), tungstic acid soluble N (TA N) and ammonia N. Results were used to calculate large peptides (LPep N = TCA N – TA N), small peptides plus amino acids (SPep+AA N = TA N – ammonia N), and ammonia N concentrations in fermenters (Licitra et al., 1996).

During sampling days, collection vessels were maintained at 4°C to prevent microbial activity. Solid and liquid effluents were mixed and homogenized for 1 min, and a 600 ml sample was removed by aspiration. Upon completion of each period, effluents from the three sampling days were composited and mixed within fermenter, and homogenized for 1 min. Subsamples were taken for total N, ammonia N, and VFA

analyses. The remainder of the sample was lyophilized. Dry samples were analyzed for dry matter (DM), ash, neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF), and purine contents.

Bacterial cells were obtained from fermenter flasks the last day of each experimental period. Solid and liquid associated bacteria were isolated using a combination of several detachment procedures (Whitehouse et al., 1994) selected to obtain the maximum detachment without affecting cell integrity. One hundred milliliters of a 2 g/l methylcellulose solution and small marbles (30 of 2 mm and 15 of 4 mm of diameter) were added to each fermenter and incubated in the same fermenter flasks at 39°C, and mixed for 1 h to remove attached bacteria. After incubation, fermenter flasks were refrigerated for 24 h at 4°C. After this incubation, fermenter contents were agitated for 1 h to dislodge loosely attached bacteria. Finally, the fermenter content was filtered through cheesecloth and washed with saline solution (8.5 g/l NaCl). Bacterial cells were isolated within 4 h by differential centrifugation at 1,000 x g for 10 min to separate feed particles, and the supernatant was centrifuged at 20,000 x g for 20 min to isolate bacterial cells. Pellets were rinsed twice with saline solution and recentrifuged at 20,000 x g for 20 min. The final pellet was recovered with distilled water to prevent contamination of bacteria with ash. Bacterial cells were lyophilized and analyzed for DM, ash, N, and purine contents. Digestion of DM, OM, NDF, ADF and crude protein (CP), and flows of total, non-ammonia, microbial, and dietary N were calculated as described by Stern and Hoover (1990).

2.1.3. Chemical Analyses

Effluent DM was determined by lyophilizing 200 ml aliquots in triplicate. The DM content of diets and bacterial samples was determined by drying samples for 24 h in a 103°C forced air oven (AOAC, 1990; method 950.01). Dry samples of diets, effluents and bacteria were ashed overnight at 550°C in a muffle furnace (AOAC, 1990; method 942.05), and OM was determined by difference. Fibre components of diets and effluents were analyzed sequentially (Van Soest et al., 1991) using a thermostable alpha-amylase and sodium sulfite, and expressed without residual ash. Total N of diets, effluents and bacterial samples was determined by a Kjeldhal method (AOAC, 1990; method 976.05). Sample CP was calculated as N x 6.25. Effluent CP was determined in liquid samples.

Peptide and amino acid N were determined as described by Winter et al. (1964). To determine TCA N, 4 ml of a 500 g/l TCA solution were added to 16 ml of filtered fermenter fluid. After 4 h at 5°C, tubes were centrifuged at 9,000 x g for 15 min. The supernatant was stored and frozen until analysed for TCA N by the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990; method 976.05). To determine TA N, 4 ml of a 100 g/l sodium tungstate solution and 4 ml of 1.07 N sulphuric acid were added to 16 ml sample of filtered fermenter fluid. After 4 h at 5°C, tubes were centrifuged at 9,000 x g for 15 min. The supernatant was stored and frozen until it was analysed for TA N by the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990; method 976.05).

Ammonia N was analyzed by colorimetry as described by Chaney and Marbach (1962), where 4 ml of a 0.2 N HCl solution were added to 4 ml of filtered rumen fluid and frozen. Samples were centrifuged at 3,000 x g for 20 min, and the supernatant was used to determine ammonia N by spectrophotometry (Libra S21, Biochrom Technology, Cambridge, UK).

Samples for VFA analysis were prepared as described by Jouany (1982) and analyzed by gas chromatography: 1 ml of a solution made up of a 2 g/l solution of mercuric chloride, 2 g/l of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 20 g/l orthophosphoric acid, was added to 4 ml of filtered rumen fluid and frozen. Samples were centrifuged at 15,000 x g for 15 min, and the supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) using a polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK).

Samples of lyophilized effluent and bacterial cells were analyzed for purine content (adenine and guanine) by HPLC as described by Balcells et al. (1992), using allopurinol as the internal standard.

2.1.3. Statistical Analyses

All statistical analyses were conducted using SAS (version 8.1 SAS Institute, Inc., Cary, NC). Results of VFA concentration and N fractions were analyzed using the PROC

MIXED procedure for repeated measures (Littell et al., 1998). The model accounted for the effects of treatments and days (for VFA, during sampling days) or hours (for the N, fractions during sampling days) and the interaction of treatment with days or hours. The period was considered a random effect. The VFA concentration and N fractions were analyzed using the compound symmetric covariance structure that yielded the largest Schwarz's Bayesian criterion. The significance of differences between means of treatments compared with CTR were declared at $P < 0.05$ using the Dunnett option. Differences between each treatment and CTR for N fractions at each hour, and between 0 hours and 2, 4, and 6 hours within treatments were tested using the Bonferroni option, and declared at $P < 0.05$.

The results of nutrient digestion and flows were analyzed as completely randomized blocks design. Main effects and its interactions were determined with the analysis of variance using the PROC MIXED procedure of SAS. Differences between each treatment and CTR were tested using the Dunnett option, and declared at $P < 0.05$.

2.2. Experiment 2

2.2.1. *Animals, Diet and Treatments*

Eight Ripollesa non-pregnant ewes (BW 57 ± 2.3 kg) were used to study the effect of BEO on rumen microbial fermentation. Animals received 1.3 kg of a diet (157 g/kg CP, 384 g/kg NDF, 245 g/kg ADF) consisting of (DM basis) alfalfa hay (349 g/kg), ryegrass hay (148 g/kg), corn grain (114 g/kg), barley grain (114 g/kg), cottonseed (79 g/kg), molasses (32 g/kg), soybean meal (16 g/kg), corn glutenfeed (116 g/kg), calcium soaps of fatty acids (12 g/kg) and the same mineral and vitamin mixture as in Experiment 1 (20 g/kg).

Four sheep were assigned at random to the control treatment (CTR, without BEO) and four sheep were assigned to a long term (4 weeks) adaptation to BEO treatment (ADBEO, 110 mg/d of BEO) that was dosed once daily by means of a gelatin capsule. Considering a rumen volumen of 10 l (rumen volum = $BW^{0.57}$, Owens and Goetsch, 1988) and a dilution rate of 0.10/h, the estimated rumen fluid flow through the rumen is around 24 l/d. Therefore, the estimated rumen concentration of BEO was approximately

5 mg/l. These animals and their ruminal fluid were used to study the effect of BEO on: a) Experiment 2a: pH, N metabolism, and total and individual VFA concentration in the rumen in CTR and ADBEO; and b) Experiment 2b: pH, ammonia N and total and individual VFA concentration using an in vitro batch fermentation using rumen fluid from control sheep alone (CTR) or plus a single dose of BEO (CTR+BEO), and ADBEO plus a single dose of BEO (ADBEO+BEO).

2.2.2. Experimental Design and Sample Collection

Experiment 2a

After an adaptation period of four weeks, 100 ml of ruminal fluid were removed at 0 and 3 h after the morning feeding and in two consecutive days using an oro-ruminal probe and a vacuum pump. The first 20 ml were discarded to prevent rumen fluid contamination with saliva. The pH was determined immediately using a portable pH-meter (model 507, CRISON, Alella, Barcelona) and samples were taken for the analysis of LPep, SPep+AA and ammonia N, and VFA concentrations. At the end of this experiment, sheep were slaughtered. Ruminal fluid of each sheep was collected and used for an in vitro trial (Experiment 2b).

Experiment 2b

The effect of long term adaptation of the rumen microflora to BEO was also evaluated in an in vitro batch fermentation (Tilley and Terry, 1963) trial with three types of rumen fluid: a) Control fluid (CTR) using rumen fluid of sheep not supplemented with BEO; b) Control fluid plus a single dose of 11 mg/l of BEO (CTR+BEO); c) Adapted fluid plus a single dose of 11 mg/l of BEO (ADBEO+BEO). Incubations for each treatment were conducted in triplicate. The substrates of fermentation were soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay. Rumen fluid was strained through two layers of cheesecloth and mixed in a 1 to 1 proportion with phosphate-bicarbonate buffer (McDougall, 1948). The incubation was conducted in a 90 ml tubes containing 50 ml of the diluted rumen fluid and 0.5 g of test feeds per tube. Each tube was gassed with CO₂ before sealing with rubber corks with a gas release valve. The incubations were

conducted in a water bath at 39°C. After 24 h, the pH was determined in each tube and liquid samples were withdrawn to analyze ammonia N and VFA concentrations.

2.2.3. *Chemical Analyses*

Large peptides, SPep+AA and ammonia N, and VFA concentrations in Experiment 2a, and ammonia N and VFA concentrations in Experiment 2b, were determined using the same procedures described in Experiment 1.

2.2.4. *Statistical Analyses*

Results of the in vivo experiment were analyzed using the PROC MIXED procedure for repeated measures (Littell et al., 1998). The day was considered random effect. Differences between treatments and CTR were declared at $P < 0.05$ using the Dunnett option.

Results of the batch fermentation experiment were analyzed as a randomized block design with three treatments (CTR, CTR+BEO and ADBEO+BEO) and four samples (feeds) using the GLM procedure of SAS. Differences between means were declared at $P < 0.05$ using the Tukey's multiple comparison test.

3. Results

Experiment 1

Dry and organic matter, NDF and ADF digestion were not affected by the addition of BEO (Table 1). Supplementation of 5 mg/l of BEO increased ($P < 0.05$) the concentration of total VFA, acetate proportion and acetate to propionate ratio, and reduced ($P < 0.05$) the proportion of propionate and valerate compared with CTR (Table 2).

Table 1. Effect of dose of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) digestion in a dual flow continuous culture (Experiment 1)

	Treatments ¹				SEM ²
	CTR	D5	D50	D500	
True Digestibility, g/kg					
DM	578	540	598	589	18.2
OM	567	548	577	566	16.5
NDF	273	276	291	307	55.6
ADF	337	372	370	387	52.3

¹Concentration of BEO: CTR =0 mg/l; D5 = 5 mg/l; D50 = 50 mg/l; D500 = 500 mg/l.

²SEM: standard error of the mean.

Table 2. Effect of dose of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on total volatile fatty acid (VFA) concentration and profile in a dual flow continuous culture (Experiment 1)

	Treatments ¹				SEM ²
	CTR	D5	D50	D500	
Total VFA, mM	116.8 ^a	125.6 ^b	116.9 ^a	117.9 ^a	2.99
VFA, mol/100 mol					
Acetate	60.4 ^a	66.6 ^b	60.3 ^a	60.4 ^a	2.01
Propionate	18.9 ^a	15.2 ^b	17.5 ^a	18.1 ^a	1.11
Butyrate	13.9	11.5	14.2	13.6	1.25
Valerate	4.05 ^a	2.69 ^b	3.71 ^a	3.99 ^a	0.40
BCVFA ³ , mM	3.23	5.09	4.99	4.68	0.92
Acetate:Propionate	3.23 ^a	4.39 ^b	3.51 ^a	3.34 ^a	0.31

¹Concentration of BEO: CTR =0 mg/l; D5 = 5 mg/l; D50 = 50 mg/l; D500 = 500 mg/l.

²SEM: standard error of the mean.

³BCVFA: Branch-chained VFA.

^{a,b} P < 0.05.

However, higher doses (50 and 500 mg/l) did not affect total VFA concentration and individual VFA proportions. Ammonia N concentration, the flow of ammonia,

nonammonia, bacterial and dietary N, the degradation of CP, and efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) were not affected by treatments (Table 3).

Table 3. Effect of dose of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on N metabolism of ruminal microorganisms in a dual flow continuous culture (Experiment 1)

	Treatments ¹				SEM ²
	CTR	D5	D50	D500	
N-NH ₃ , mg/100 ml	13.2	15.0	15.6	13.4	1.63
N Flow, g/d					
Ammonia	0.42	0.48	0.49	0.42	0.05
Non-Ammonia	3.55	3.30	3.32	3.53	0.13
Bacterial	1.67	1.51	1.66	1.57	0.17
Dietary	1.88	1.79	1.67	1.96	0.20
CP Degradation, g/kg	374	407	448	351	65.5
EMPS ³	30.6	28.6	29.9	28.7	2.76

¹Concentration of BEO: CTR = 0 mg/l; D5 = 5 mg/l; D50 = 50 mg/l; D500 = 500 mg/l.

²SEM: standard error of the mean.

³EMPS: Efficiency of microbial protein synthesis (g bacterial N /kg organic matter truly digested).

The average concentration of LPep N tended ($P = 0.08$) to be lower in D5 compared with CTR. However, the average SPep+AA N and ammonia N concentrations were not affected by treatments (Table 4). The concentration of LPep N in CTR decreased in the first 2 h after feeding, and returned to pre-feeding levels thereafter. Similar evolution was observed in D50. The concentration of LPep N in D500 also decreased in the first 2 h after feeding, but this concentration stayed low until 6 h after feeding compared with 0 h. The concentration of LPep N in D5 was not affected by time after feeding. But only in D5, the concentration of LPep N 6 h after feeding was lower ($P < 0.05$) compared with CTR. The concentration of SPep+AA N in all treatments was higher at 2, 4 and 6 h after feeding compared with 0 h, with the exception of D5 at 6 h. The ammonia N concentration in CTR was higher ($P < 0.05$) 2 h after feeding and lower ($P < 0.05$) 4 and 6 h after feeding than 0 h. Similar evolution was observed in D500. The ammonia N concentration in D50 was higher ($P < 0.05$) at 2 and 4 h after feeding, and the ammonia

N concentration in D5 was only higher ($P < 0.05$) at 2 h after feeding compared with 0 h.

Table 4. Effect of dose of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on N fraction concentrations (Experiment 1)

	Treatments ¹				SEM ²
	CTR	D5	D50	D500	
LPep N, mg/100 ml					
Average	5.98	4.88 [*]	5.58	5.57	0.46
0	6.79	5.14	6.87	7.32	0.74
2	4.85 ^z	4.32	4.68 ^z	4.91 ^z	
4	5.42	5.18	5.22	4.66 ^z	
6	6.85	4.89 ^a	5.57	5.38 ^z	
SPep+AA N, mg/100 ml					
Average	4.90	4.73	4.98	4.59	0.34
0	1.48	2.44	1.70	0.79	0.64
2	8.65 ^z	7.53 ^z	8.64 ^z	8.26 ^z	
4	5.60 ^z	5.06 ^z	5.68 ^z	5.49 ^z	
6	3.86 ^z	3.90	3.91 ^z	3.82 ^z	
Ammonia N, mg/100 ml					
Average	10.6	12.2	12.7	10.5	1.35
0	11.08	12.18	12.94	10.99	1.40
2	12.57 ^z	14.21 ^z	14.66 ^z	12.55 ^z	
4	9.35 ^z	11.21	11.53 ^z	9.25 ^z	
6	9.33 ^z	11.18	11.67	9.32 ^z	

¹Concentration of BEO: CTR =0 mg/l; D5 = 5 mg/l; D50 = 50 mg/l; D500 = 500 mg/l.

²SEM: standard error of the mean.

* $P < 0.10$.

^{a,b} $P < 0.05$ (Treatments vs. Control within hour differ).

^{y,z} $P < 0.05$ (Each hour vs. 0 hour within treatment differ).

Experiment 2

*Effects of long term adaptation to BEO on in vivo rumen fermentation profile
(Experiment 2a)*

There were no significant interactions between hour postfeeding (0 vs 3) and treatments (CTR vs BEO) on rumen fermentation profile. Therefore, results are presented by main effects (Table 5 and 6).

Table 5. Effect of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on pH and total volatile fatty acid (VFA) concentration and profile of the rumen (Experiment 2a)

	Treatments				SEM ³	P < ²	
	Hour		Treatment ¹			Hour	Treatment
	0	3	CTR	ADBEO			
pH	7.38	6.85	6.91	7.31	0.29	**	NS
Total VFA, mM	92.3	130.3	115.3	107.2	13.1	***	NS
VFA, mol/100 mol							
Acetate	65.5	64.2	64.0	65.8	0.86	*	†
Propionate	15.1	17.2	16.8	15.6	0.76	***	NS
Butyrate	14.8	15.1	15.4	14.4	0.88	NS	NS
Iso-Butyrate	1.54	0.97	1.18	1.33	0.19	***	NS
Valerate	0.96	1.36	1.22	1.09	0.08	***	†
Iso-Valerate	2.09	1.15	1.52	1.73	0.27	***	NS
BCVFA ⁴ , mM	2.92	2.65	2.86	2.71	0.24	NS	NS
Acetate:Propionate	4.42	3.76	3.88	4.30	0.25	***	NS

¹CTR = Control rumen fluid; ADBEO = Adapted rumen fluid (110 mg/d of BEO).

²NS = P > 0.10; † P < 0.10; * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

³SEM: standard error of the mean.

⁴BCVFA: Branch-chained VFA.

Total VFA concentration and the proportion of propionate, valerate and isovalerate were higher (P < 0.001) and the proportion of acetate and isobutyrate, and acetate to propionate ratio were lower (P < 0.05) at 3 than at 0 h (Table 5). The proportion of butyrate and the concentration of branch-chained VFA (BCVFA) were not affected by

time after feeding. The pH decreased ($P < 0.05$) at 3 h compared with 0 h (Table 2.1). The concentration of SPep+AA and ammonia N concentration increased ($P < 0.05$) at 3 h (Table 6) compared with 0 h.

Table 6. Effect of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on N fraction concentrations of the rumen (Experiment 2a)

	Treatments					$P <^2$	
	Hour		Treatment ¹		SEM ³	Hour	Treatment
	0	3	CTR	ADBEO			
N fractions, mg/100 ml							
LPep N	7.01	8.07	7.92	7.15	0.87	NS	NS
SPep+AA N	11.0	14.5	13.5	12.0	2.37	*	NS
Ammonia N	21.9	26.5	26.3	22.1	2.46	**	NS

¹CTR = Control rumen fluid; ADBEO = Adapted rumen fluid (110 mg/d of BEO).

²NS = $P > 0.10$; † $P < 0.10$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$.

³SEM: standard error of the mean.

The addition of BEO tended to increase ($P < 0.10$) the proportion of acetate and tended to decrease ($P < 0.10$) the proportion of valerate compared with CTR, but had no effect on total VFA and the remaining proportions of VFA. The addition of BEO had no effect on N metabolism and pH.

Effects of long term adaptation to BEO on in vitro rumen fermentation profile (Experiment 2b)

There were no significant interactions between treatments (CTR, CTR+BEO and ADBEO+BEO fluid) and feeds (soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay). Therefore, results are presented by main effects (Table 7 and 8).

The final pH of the incubation and the ammonia N concentration were lower ($P < 0.05$) in corn meal than in other supplements (Table 7). Total VFA concentration was lower ($P < 0.05$) in ryegrass hay than in the other supplements. The proportion of acetate was lower ($P < 0.05$) in soybean meal compared with alfalfa hay. The acetate to propionate ratio was lower ($P < 0.05$), and BCVFA concentration was higher ($P < 0.05$) in soybean

meal compared with the rest of supplements. The proportion of propionate, valerate, isobutyrate and isovalerate were lower ($P < 0.05$) and butyrate proportion was higher ($P < 0.05$) in corn meal compared with other supplements.

Table 7. Effect of four supplements on pH, ammonia N concentration and total and individual VFA concentration in in vitro fermentation (Experiment 2b)

	Treatments ¹				SEM ²
	SBM	CM	AH	RH	
pH	6.60 ^a	6.20 ^b	6.58 ^a	6.56 ^a	0.05
Ammonia N, mg/100 ml	118.9 ^a	77.8 ^c	98.6 ^b	94.2 ^{bc}	4.62
Total VFA, mM	156.8 ^a	159.4 ^a	147.2 ^{ab}	135.6 ^b	5.58
VFA, mol/100 mol					
Acetate	57.5 ^b	58.9 ^{ab}	60.4 ^a	59.1 ^{ab}	0.45
Propionate	18.3 ^a	13.8 ^c	16.3 ^b	16.7 ^b	0.28
Butyrate	14.6 ^b	20.8 ^a	14.8 ^b	15.6 ^b	0.46
Iso-Butyrate	2.24 ^a	1.64 ^b	2.08 ^a	2.12 ^a	0.08
Valerate	2.52 ^a	1.68 ^b	2.43 ^a	2.27 ^a	0.06
Iso-Valerate	4.73 ^a	3.24 ^b	4.11 ^a	4.24 ^a	0.18
BCVFA ⁴ , mM	10.7 ^a	7.69 ^b	9.02 ^b	8.49 ^b	0.45
Acetate:Propionate	3.21 ^c	4.31 ^a	3.75 ^b	3.59 ^b	0.08

¹SBM = Soybean meal; CM = Corn meal; AH = Alfalfa hay; RH = Ryegrass hay.

²SEM: standard error of the mean.

³BCVFA: Branch-chained VFA.

^{a,b} $P < 0.05$.

The final pH of the incubation was similar in the three treatments (average of 6.49; Table 8). The ammonia N concentration in ADBEO+BEO fluid was lower ($P < 0.05$) compared with CTR. Total VFA concentration was similar among treatments (average of 149.8 mM). The proportion of acetate and acetate to propionate ratio was higher ($P < 0.05$) in ADBEO+BEO fluid compared with CTR. The proportion of propionate and isovalerate, and BCVFA (mM) concentration in ADBEO+BEO fluid were lower ($P < 0.05$) compared with CTR. The proportion of butyrate, isobutyrate and valerate were similar among treatments. The CTR+BEO fluid had no effect on microbial fermentation profile compared with CTR.

Table 8. Effect of long term adaptation to a specific blend of essential oil compounds (BEO) on pH, ammonia N concentration and total and individual VFA concentration in in vitro fermentation (Experiment 2b)

	Treatments ¹			SEM ²
	CTR	CTR+BEO	ADBEO+BEO	
pH	6.48	6.49	6.49	0.04
Ammonia N, mg/100 ml	102.1 ^a	102.4 ^a	87.7 ^b	4.06
Total VFA, mM	153.6	150.4	145.3	4.91
VFA, mol/100 mol				
Acetate	58.1 ^b	58.1 ^b	60.6 ^a	0.39
Propionate	16.7 ^a	16.5 ^a	15.6 ^b	0.25
Butyrate	16.6	16.8	15.9	0.40
Iso-Butyrate	2.09	2.10	1.88	0.07
Valerate	2.23	2.22	2.22	0.06
Iso-Valerate	4.29 ^a	4.30 ^a	3.66 ^b	0.16
BCVFA ³ , mM	9.62 ^a	9.47 ^a	7.86 ^b	0.39
Acetate:Propionate	3.54 ^b	3.59 ^b	4.01 ^a	0.07

¹CTR = Control rumen fluid; CTR+BEO = Control rumen fluid plus a single dose of BEO; ADBEO+BEO = Adapted rumen fluid plus a single dose of BEO.

²SEM: standard error of the mean.

³BCVFA: Branch-chained VFA.

^{a,b} P < 0.05.

4. Discussion

Experiment 1

In a previous in vitro study in the same dual flow continuous culture system, Castillejos et al. (2005) observed that supplementation with 1.5 mg/l of BEO resulted in an increase in total VFA concentration without affecting other fermentation parameters. McIntosh et al. (2003) and Newbold et al. (2004) observed an inhibition of deamination of amino acids in in vitro incubation with ruminal fluid from animals receiving 1,000 g/cow/d or 110 g/sheep/d, respectively (approximately 5-10 mg/l). The lack of effect of

BEO on N metabolism suggested that the dose of BEO used (1.5 mg/l) by Castillejos et al. (2005) could have been too low. In the present study, the aim of Experiment 1 was to evaluate three different doses (5, 50 and 500 mg/l) of BEO on rumen microbial fermentation. Digestibilities of DM, OM, NDF and ADF were within expected ranges and not affected by the dose of BEO. These results suggest that BEO did not modify nutrient fermentability and agree with those observed in a previous study (Castillejos et al., 2005).

Supplying 5 mg/l of BEO increased by 8% the concentration of total VFA, increased by 10 percentage units the acetate proportion and reduced by 20 percentage units the proportion of propionate compared with CTR, increasing the acetate to propionate ratio. However, higher doses had no effect on VFA concentration and proportions. The increase in the total VFA concentration agrees with a previous study with a low dose of BEO, although no effects on acetate and propionate proportion were observed, possibly due to the lower dose used in that trial (Castillejos et al., 2005). Newbold et al. (2004) also observed that total VFA concentration tended to be higher at 6 h after feeding in sheep supplemented with 110 mg/d (estimated at 5 mg/l) of BEO. The main compounds of BEO are thymol, limonene and guaiacol. Thymol (*5-methyl-2-isopropylphenol*) is a major essential oil component of thyme (*Thymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*). In an in vitro study in the same dual flow continuous cultures system, Cardozo et al. (2004) also reported that the addition of 0.22 mg/l of oregano (*origanum vulgare*, containing 64% of carvacrol and 16% thymol) reduced the molar proportion of propionate and increased the molar proportion of acetate and the acetate to propionate ratio during the first 6 days of fermentation, although these effects disappeared thereafter probably due to low dose of oregano. Evans and Martin (2000) reported that thymol (400 mg/l) increased the acetate to propionate ratio but it also decreased the total VFA concentration, suggesting that the dose used was toxic to rumen bacteria. In the present trial the highest dose of 500 mg of BEO/l did not affect diet fermentability because thymol is only a part of the BEO additive. These experiments indicate that an optimal dose may be required to observe and preserve the effects of BEO on rumen microbial fermentation. In the present trial, supplementation of 5 mg/l of BEO appears to be optimal for modifying rumen microbial fermentation. The lack of agreement observed between the different studies could be due to the diversity of essential oils

compounds of BEO which makes it difficult to compare with studies conducted with single plant extracts as oregano or pure substances as thymol.

Several studies (Richardson et al., 1976; Lana and Russell, 1997) demonstrated that monensin supplementation, a growth promoter used in animal feeds, increased total VFA concentration. However, the addition of monensin increased the proportion of propionate and reduced the proportion of acetate and butyrate, suggesting that the mechanism of action may not be the same than the mechanism of essential oils compounds in BEO. In fact, monensin affects only some gram positive bacteria, while essential oils inhibit gram positive and gram negative bacteria (Helander et al., 1998). Ruminant gram positive bacteria are involved in fermentation processes that produce, among other end products, acetate, butyrate, formate, lactate, hydrogen, and ammonia. On the other hand, ruminant gram negative bacteria are involved in fermentation processes associated with the production of propionate and succinate (Russell and Strobel, 1989). We may hypothesize that the fermentation pattern observed in BEO is mediated through a stronger inhibition of the gram negative rumen bacteria in contrast to monensin that inhibits mainly gram positive rumen bacteria.

In the present trial, there were no effects of doses of BEO on the flow of ammonia, nonammonia, bacterial and dietary N, the degradation of crude protein, or EMPS. Results agree with Castillejos et al. (2005) who reported no effects on any of these parameters. In contrast, several studies observed that the addition of BEO decreased the effective degradability and the rate of ruminal degradation of some protein supplements (Molero et al., 2004; Newbold, et al., 2004). Protein degradation is a complex process that includes proteolysis, peptidolysis and deamination. In the present trial LPep, SPep+AA and ammonia N concentration were studied from 0 to 6 h after feeding. The average LPep N concentration (mg/100 ml) tended ($P = 0.08$) to be lower in D5 (4.88) compared with CTR (5.98). The D5 of BEO decreased by 18% LPep N concentration, suggesting that BEO inhibited proteolysis or stimulated peptidolysis. There were no effects of the higher doses of BEO on the average LPep N concentration. There were no effects of the doses of BEO on the average SPep+AA N and ammonia N concentrations. In contrast, several *in vitro* 24 h incubation trials with BEO demonstrated that the breakdown of amino acids to ammonia was inhibited without affecting the proteolytic or peptidolytic activity (McIntosh et al., 2003; Newbold et al., 2004). However, these

studies used ruminal fluid of sheep that received BEO during a period from 4 to 6 weeks. Wallace et al. (2003) suggested that the adaptation period of the rumen fluid to the addition of BEO could be important. We may hypothesize that an adaptation time longer than the 6 days used in the present trial may be required to observe changes in ammonia N concentration.

The first experiment confirmed that the optimal dose of BEO in a continuous culture system was close to 5 mg/l because of its effects on VFA, but the effects on N metabolism were negligible. The lack of effect of BEO on protein degradation could be attributed to the adaptation period of the rumen fluid to the addition of BEO. Molero et al. (2004) reported that BEO only reduced protein degradation of soybean meal and sunflower meal when the adaptation period was extended to 28 d, suggesting that adaptation period may be important to reveal the effects of BEO on protein degradation.

Experiment 2

After 4 weeks of adaptation to BEO, total VFA concentration in the rumen and in vitro batch fermentation were not affected. Similar results were reported by Wallace et al. (2002) and Newbold et al. (2004). However, results from continuous culture in previous trials (Experiment 1; Castillejos et al., 2005) reported that total VFA concentration increased after supplementing BEO. The lack of effect of BEO on total VFA concentration in this second in vivo experiment could be attributed to the absorption of VFA in the rumen of sheep. López et al. (2003) reported an increase in the absorptive capacity due to high VFA concentrations in the ruminal fluid, confirming that VFA absorption in the rumen is mainly a concentration-dependent process. These results may explain why in continuous culture, where VFA absorption does not exist, we observe an increase in total VFA concentration. In vitro batch fermentation of rumen fluid from sheep adapted to BEO resulted in an increase in the proportion of acetate and in the acetate to propionate ratio, and a decrease in the proportion of propionate and in the concentration of BCVFA. These changes in the fermentation profile are similar to those observed in the continuous culture experiment. The proportions of VFA in the rumen of sheep adapted to BEO was consistent with these observations, where the proportion of acetate tended to increase, the proportion of valerate tended to decrease, and

numerically ($P > 0.10$) the proportion of propionate decreased and acetate to propionate ratio increased.

Average pH in vivo was 7.1, decreased after feeding as expected, but was not affected by the addition of BEO. Newbold et al. (2004) also reported that the use of BEO had no effect on pH measured in vivo. The supplementation of BEO in in vitro trial did not affect pH either.

Several studies (McIntosh et al., 2003; Molero et al., 2004; Newbold et al., 2004) demonstrated that BEO inhibited proteolysis and amino acid deamination. Some of these studies suggested that at least 28 days adaptation period of rumen microbial population may be required to observe the effects of BEO on rumen N metabolism (Wallace et al., 2003; Molero et al., 2004). In vivo, BEO had no effect on N metabolism. However, the addition of BEO in vivo had a 16% numerical ($P > 0.10$) decrease in ammonia N concentration. The small number of samples and the high standard errors in vivo compared with in vitro could explain the lack of significant effects in in vivo fermentation profile. Newbold et al. (2004) also reported that ammonia N concentration measured in vivo was unaffected. However, the same authors observed that deamination of amino acids from casein acid hydrolysate decreased by 25%, when measured in vitro using rumen fluid obtained from sheep supplemented with BEO during 6 weeks. In the in vitro trial using rumen fluid adapted to BEO we also observed a 14% decrease of the ammonia N concentration. This result suggests that deamination was reduced. The decrease in BCVFA concentration in rumen fluid adapted to BEO is consistent with the inhibition of the deamination process (Allison et al., 1962). McIntosh et al. (2003) also observed a decrease in the rate of ammonia production from casein acid hydrolysate and demonstrated that BEO inhibited the growth of several representatives of the ammonia hyperproducing bacteria in pure culture (*Clostridium sticklandii* and *Peptostreptococcus anaerobius*). In the in vitro batch fermentation trial, CTR+BEO fluid had no effect on ammonia N concentration, total VFA concentration and individual VFA proportions. In contrast, in the in vitro trial with rumen fluid adapted to BEO, ammonia N concentration, total VFA concentration and individual VFA proportions were affected. The effects of BEO on VFA profile were not observed after 24 h in vitro incubations, but after 6 d of fermentation in continuous culture, BEO affected VFA profile, suggesting that the effects of BEO on

the VFA concentration and proportions required an adaptation time of at least 6 d. In contrast, an adaptation time of 4 weeks was necessary to observe an effect on ammonia N concentration. Results indicate that at 5 mg/l the VFA profile was modified after 6 d of fermentation, but the effects on N metabolism required 28 d of adaptation.

5. Conclusion

The addition of 5 mg BEO/l rumen fluid in continuous culture increased total VFA concentration, the proportion of acetate and the acetate to propionate ratio, and decreased the proportion of propionate and valerate, and the concentration of large peptide N. When the adaptation period was extended to 4 weeks in rumen fluid of sheep, BEO increased the proportion of acetate and acetate to propionate ratio, and decreased the proportion of propionate, but also reduced BCVFA and ammonia N concentration, suggesting that deamination was inhibited. The results of both experiments suggest VFA concentration and proportions only require a short adaptation time, higher to 24 h but lower to 6 d. However, N metabolism required an adaptation time of up to 4 weeks. The addition of essential oils can shift the microbial fermentation in the rumen, modifying the production of VFA by increasing the acetate to propionate ratio, and changing N metabolism by inhibiting deamination.

6. References

- Allison, M. J., Bryant, M. P., Doestch, R. N., 1962. Studies on the metabolic function of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci. I. Incorporation of isovalerate into leucine. *J. Bacteriol.* 83, 523-532.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis* (15th Ed). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Balcells, J., Guada, J. A., Peiró, J. M., Parker, D. S., 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Cromatogr.* 575, 153-157.
- Cardozo, P., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2004. Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profile in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82, 3230-3236.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R., 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119, 29-41.
- Chaney, A. L., Marbach, E. P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8, 130-132.
- Evans, J. D., Martin, S. A., 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.* 41, 336-340.
- Helander, I. M., Alakomi, H-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590-3595.
- Hoffmann, C., Evans, C. A., 1911. The use of spices as preservatives. *J. Ind. Eng. Chem.* 3, 835-838.
- Hoover, W. H., Crooker, B. A., and Sniffen, C. J. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:528-534.
- Jouany, J. P., 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliments.* 2, 131-144.

- Lana, R. P., Russell, J. B., 1997. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intakes. *J. Anim. Sci.* 75, 224-229.
- Licitra, G., Hernandez, T. M., Van Soest, P. J., 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 57, 347-358.
- Littell, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 75:1216-1231.
- López, S., Hovell, F. D. D., Dijkstra, J., France, J., 2003. Effects of volatile fatty acid supply on their absorption and on water kinetics in the rumen of sheep sustained by intragastric infusions. *J. Anim. Sci.* 81, 2609-2616.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99-109.
- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beaver, D. A., Newbold, C. J., 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5011-5014.
- Molero, R., Ibars, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R., 2004. Effect of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate rations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 91-104.
- National Research Council, 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle* (7th rev. Ed). National Academy Press., Washington, DC.
- Newbold, C. J., McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 114, 105-112.
- Owens, F. N., A. L. Goetsch. 1988. Ruminal Fermentation. In: *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*, 145-171. D. C. Church (ed.) Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.
- Richardson, L. F., Raun, A. P., Potter, E. L., Cooley, C. O., Rathmacher, R. P., 1976. Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* 43, 657-664.
- Russell, J. B., Strobel, H. J., 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55,1-6.
- Statistical Analysis Systems (SAS) Institute, 1989. *SAS User's Guide*. SAS Institute, Cary, NC.

- Stern, M. D., Hoover, W. H., 1990. The dual flow continuous culture system. In: Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or fermentation, pp 17-32. Northeast ADSA-ASAS Regional meeting, Chazy, NY.
- Tilley, J. M. A., Terry, R. A., 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Brit. Grassland Soc.* 18,104-111.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Wallace, R. J., McEwan, N. R., McIntosh, F. M., Teferedegne, B., Newbold, C. J., 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 10, 1458-1468.
- Wallace, R. J., McEwan, N. R., McIntosh, F. M., Newbold, C. J., 2003. Natural products for manipulation of fermentation in ruminants. In: Proc. 50th Maryland Nutr. Conf., March 27-28, Timonium, Maryland, pp.116-125.
- Weller R. A., and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32:341-352.
- Whitehouse, N. L., Olson, V. M., Schwab, C. G., Chesbro, W. R., Cunningham, K. D., Lycos, K. D., 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72, 1335-1343.
- Winter, K. A., Johnson, R. R., Dehority, B. A., 1964. Metabolism of urea nitrogen by mixed cultures of rumen bacteria grown on cellulose. *J. Anim. Sci.* 97, 793-797.

CAPÍTULO 4

Efecto de compuestos fenólicos sobre la fermentación microbiana ruminal y el flujo de
nutrientes en sistemas in vitro

**Effect of phenolic compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow
in in vitro systems**

Effect of phenolic compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems

Abstract

Two experiments were conducted to determine the effects of several phenolic compounds on rumen microbial fermentation. In the first experiment, the effects of 4 different doses (5, 50, 500, and 5000 mg/L) of five essential oil compounds were evaluated in in vitro 24 h batch culture of rumen fluid with two different diets: a 60 to 40 forage to concentrate diet (18% CP; 30% NDF) and a 10 to 90 forage to concentrate diet (16% CP; 25% NDF). Treatments were: control (CTR), eugenol (EUG), guaiacol, limonene, thymol (THY), and vanillin. After 24 h, the pH was determined in the culture fluid and samples were collected to analyze ammonia N and volatile fatty acids (VFA). Differences were declared at $P < 0.05$. The highest dose of all compounds increased the final pH and decreased total VFA concentration in both diets, and will not be discussed further. All other results are presented by type of diet. In the 60:40 forage to concentrate diet; EUG at 5 mg/L (E5) tended ($P < 0.10$) to reduce the proportion of acetate and the acetate to propionate ratio, at 500 mg/L (E500) reduced the proportion of propionate and branch-chained VFA (BCVFA) concentration, and at 50 mg/L (E50) and E500 tended ($P < 0.10$) to reduce ammonia N concentration, without affecting total VFA concentration. Guaiacol at 500 mg/L reduced the proportion of acetate and ammonia N concentration, and vanillin at 500 mg/L reduced the proportion of acetate. Guaiacol at 5 and 50 mg/L, limonene at 50 and 500 mg/L and THY at 500 mg/L also decreased total VFA concentration. In the 10:90 forage to concentrate diet; all doses of guaiacol increased ammonia N concentration. Limonene at 5 and 500 mg/L and THY at 5 and 50 mg/L only increased the final pH. Vanillin at 5, 50 and 500 mg/L reduced the proportion of propionate and increased the acetate to propionate ratio, and at 50 mg/L also increased total VFA, ammonia N and BCVFA concentrations. In the second experiment, eight dual flow continuous culture fermenters (1320 mL) were used in three periods (6 d of adaptation and 3 d of sampling) to study the effects of THY and EUG on rumen microbial fermentation and nutrient flow. Fermenters were fed 95 g/d of DM of a

60 to 40 forage to concentrate diet (18% CP; 30% NDF) in three times per day. Treatments were: CTR (negative control), T5 (5 mg/L of THY), T50 (50 mg/L of THY), T500 (500 mg/L of THY), E5, E50, E500 and MON (positive control, 10 mg/L of monensin), and were randomly assigned to fermenters within periods. During the last 3 d of each period, samples were taken at 0, 2, 4 and 6 h after the morning feeding and analyzed for peptide, AA and ammonia N concentrations, and total and individual VFA concentrations. Treatments T500 and MON reduced DM, OM, NDF and ADF digestion compared with CTR. Treatments T500 and E500 reduced total VFA concentration, and T5, T500, E500 and MON modified the VFA profile compared with CTR. T5 tended to reduce ($P < 0.10$) the proportion of acetate and increased the proportion of butyrate, and T500, E500 and MON reduced the proportion of acetate and BCVFA concentration and the acetate to propionate ratio, and increased the proportion of propionate. Besides, T500 and E500 increased the proportion of butyrate and MON reduced it, and T500 reduced the proportion of valerate and E500 increased it. The concentration of large peptide N was higher in T5, T500 and E500 compared with CTR. The concentration of small peptide and AA N was higher in T500. The concentration of ammonia N tended to be higher in MON. Most of these essential oil compounds demonstrated their antimicrobial activity decreasing total VFA concentration at high doses. However, EUG in batch fermentation and T5 in continuous culture modified VFA profile without decreasing total VFA concentration, and EUG decreased ammonia N concentration. Careful selection of these essential oils compounds may allow manipulation of rumen microbial fermentation.

Keywords: Essential oil, thymol, eugenol, rumen fermentation.

Abbreviations: ADF = acid detergent fibre; BCVFA = branch-chained volatile fatty acid; CP = crude protein; CTR = control treatment; DM = dry matter; E5 = 5 mg/L of eugenol; E50 = 50 mg/L of eugenol; E500 = 500 mg/L of eugenol; EMPS = efficiency of microbial protein synthesis; MON = 10 mg/L of monensin; NDF = neutral detergent fibre; OM = organic matter; T5 = 5 mg/L of thymol; T50 = 50 mg/L of thymol; T500 = 500 mg/L of thymol; VFA = volatile fatty acid.

1. Introduction

Many herbs and plant extracts have antimicrobial activities against a wide range of bacteria, yeasts and moulds (Thompson, 1986; Ultee et al., 2002; Voda et al., 2003). Essential oils are plant secondary metabolites responsible for the odour and colour of plants and spices, and their antibacterial, antifungal, and antioxidant properties can be used as natural additives in animal feeds. Most essential oils are classified as Generally Recognized As Safe (GRAS) food additives and have been approved for food and beverage consumption by the U.S. Food and Drug Administration (FDA, 1998; www.cfsan.fda.gov). The potential use of essential oils as natural antimicrobial agents is less exploited than their uses as flavouring and antioxidant compounds (Youdin and Deans, 1999).

Essential oils can comprise more than a hundred individual components (Guillén and Manzanos, 1998). Major components can constitute up to 95% of the essential oil, whereas other components are present only as traces (Davidson and Naidu, 2000). Phenolic components, such as eugenol (present in clove bud), or thymol and carvacrol (present in oregano), are often responsible for the antibacterial properties of many essential oils (Cosentino et al., 1999; Dorman and Deans, 2000) and appear to act as membrane permeabilizers (Helander et al., 1998). Although some essential oils and their active compounds have a wide spectrum of antimicrobial activity (Dorman and Deans, 2000), gram-positive are generally more sensitive than gram-negative bacteria (Smith-Palmer et al., 1998). However, few plant extracts have been tested for their effects on ruminal microbial fermentation (Evans and Martin, 2000; Cardozo et al., 2004; Castillejos et al., 2005).

The objective of the present study was to evaluate the effects of different doses of five essential oil compounds on ruminal microbial fermentation in two *in vitro* studies.

2. Material and Methods

2.1. Experiment 1

2.1.1. Diet and Treatments

The effects of five essential oil compounds were evaluated in an in vitro batch fermentation (Tilley and Terry, 1963) trial with two different diets, a 60 to 40 forage to concentrate diet (18% CP, 30% NDF, 22% ADF) and a 10 to 90 forage to concentrate diet (16% CP, 25% NDF, 11% ADF). The 60 to 40 diet consisted of (DM basis) alfalfa hay (60.3%), ground corn grain (17.2%), ground barley grain (12.2%), soybean meal (9.7%) and a vitamin and mineral mixture (0.6%). The 10 to 90 diet consisted of ground barley grain (31.5%), ground corn grain (22.0%), wheat middlings (14.8%), soybean meal (13.5%), barley straw (10.0%), corn gluten feed (7.7%) and a vitamin and mineral mixture (0.5%). Treatments were: Control (CTR, no additive); thymol (THY, 5-methyl-2-(1-methylethyl)phenol; reference T-0501 Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO); eugenol (EUG, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol; reference E-51791 Sigma-Aldrich Chemical); limonene (1-methyl-4-(1-methylethenyl)cyclohexene; reference 183164 Sigma-Aldrich Chemical); guaiacol (2-methoxyphenol; reference G-5502 Sigma-Aldrich Chemical); and vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde; reference V-2375 Sigma-Aldrich Chemical). Four different doses of each additive were used: 5, 50, 500, and 5000 mg/L of the culture fluid.

Incubations were conducted using rumen fluid from two fistulated dairy cows fed a 60 to 40 forage to concentrate ratio diet. Rumen fluid was strained through two layers of cheesecloth and mixed in a 1 to 1 proportion with phosphate-bicarbonate buffer (McDougall, 1948). The incubation was conducted in a 90 mL tubes containing 50 mL of diluted fluid and 0.5 g of the diets per tube. Each tube was gassed with CO₂ before sealing with rubber corks with a gas release valve. The three lower doses of all compounds were dissolved in ethanol and a total of 0.2 mL were added to the culture fluid. The dose 5000 mg/L of all compounds (0.25 mL) were supplied directly to each tube plus 0.2 mL of ethanol. The CTR treatment was also supplied 0.2 mL of ethanol. Treatments were tested at an initial pH of 7.0 in the 60 to 40 forage to concentrate diet,

and at an initial pH of 6.0 in the 10 to 90 forage to concentrate diet. Incubations were conducted in a water bath at 39°C.

2.1.2. Sample Collection and Chemical Analyses

After 24 h, liquid samples were withdrawn from each tube to determine pH and analyze ammonia N and VFA concentrations.

Ammonia N was analyzed by colorimetry as described by Chaney and Marbach (1962), where 4 mL of a 0.2 N HCl solution were added to 4 mL of filtered rumen fluid and frozen. Samples were centrifuged at 3,000 x g for 20 min, and the supernatant was used to determine ammonia N by spectrophotometry (Libra S21, Biochrom Technology, Cambridge, UK).

Samples for VFA analysis were prepared as described by Jouany (1982) and analyzed by gas chromatography: 1 mL of a solution made up of a 2 g/L solution of mercuric chloride, 2 g/L of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 20 g/L orthophosphoric acid, was added to 4 mL of filtered rumen fluid and frozen. Samples were centrifuged at 15,000 x g for 15 min, and the supernatant was analyzed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) using a polyethylene glycol TPA treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK).

2.1.3. Statistical Analyses

Compounds were tested in duplicate in each diet, and fermentations were repeated in two separate days. Results of the batch fermentation experiment were analyzed as a randomized block design using the PROC MIXED procedures of SAS (version 8.1 SAS Institute, Inc., Cary, NC). The day was considered a random effect. Differences between means and CTR were tested using the Dunnett multiple comparison test and declared at $P < 0.05$.

2.2. Experiment 2

2.2.1. Fermenters, Diet and Treatments

Eight 1320 mL dual flow continuous culture fermenters developed by Hoover et al. (1976) were used in three replicated periods. Each experimental period consisted of 6 d for adaptation of the ruminal fluid to the additives and to the continuous culture system, and 3 d for sampling.

All fermenters were fed 95 g/d of DM of a diet formulated to meet or exceed current nutrient recommendations for lactating dairy cows (18.0% CP, 30.2% NDF, 21.7% ADF; NRC, 2001) and was fed in three equal portions at 0800, 1600 and 2400 h. The diet (DM basis) consisted of alfalfa hay (60.3%), ground corn grain (17.2%), ground barley grain (12.2%), soybean meal (9.7%) and a vitamin and mineral mixture (0.6%). The vitamin and mineral mixture contained, per kg of DM: 7 mg Co; 167 mg Cu; 33 mg I; 2660 mg Mn; 27 mg Se; 4660 mg Zn; and 1000 KIU of vitamin A, 200 KIU of vitamin D₃, and 1330 mg of vitamin E; 267 g of urea, 67 g of NaCl; 33 g of sulphur and 300 g of MgO.

Three different doses of THY and EUG were used in the present experiment. Treatments were: a negative control without additive (CTR), THY at 5 (T5), 50 (T50) and 500 mg/L (T500), and EUG at 5 (E5), 50 (E50) and 500 mg/L (E500), and a positive control with monensin at 10 mg/L (MON; M5273 Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO). Treatments were incorporated directly into the fermenter fluid one minute before each feeding. The dose 5 and 50 of THY and EUG, and monensin were dissolved in ethanol. The high dose was supplied directly to the fermenters plus the equivalent amount of ethanol (0.4 mL per feeding). Fermenters with the CTR treatment were also supplied 0.4 mL of ethanol per feeding.

On the first day of each period, fermenters were inoculated with undiluted ruminal fluid taken from a cow fed a 60 to 40 forage to concentrate ratio diet. Fermentation conditions were maintained constant with a temperature of 39°C, and pH at 6.4 ± 0.05 by infusion of 3 N HCl or 5 N NaOH, and monitored and controlled by a computer and a Programmable Linear Controller (FieldPoint, National Instruments, TX). Anaerobic

conditions were maintained by infusion of N₂ gas at a rate of 40 mL/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into flasks and contained 0.4 g/L of urea to simulate recycled N. Infusion of saliva and flows of filtered liquid were set to maintain a liquid and solid dilution rates at 0.10 and 0.05 h⁻¹, respectively.

2.2.2. Sample Collection

On the adaptation days, 8 mL of filtered fermenter fluid were taken 2 h after the morning feeding to determine ammonia N and VFA concentrations. During the last three days, 4 mL of filtered fermenter fluid were taken at 2 h after the morning feeding to determine VFA concentration and 36 mL were also taken at 0, 2, 4 and 6 h after the morning feeding to determine tungstic acid soluble N (TA N), trichloroacetic acid soluble N (TCA N) and ammonia N concentrations. Results were used to calculate large peptides (LPep N = TCA N – TA N), small peptides plus amino acid (SPep+AA N = TA N – ammonia N), and ammonia N concentrations in fermenters.

During sampling days, collection vessels were maintained at 4°C to prevent microbial activity. Solid and liquid effluents were mixed and homogenized for 1 min, and a 600 mL sample was removed by aspiration. Upon completion of each period, effluents from the three sampling days were composited and mixed within fermenter, and homogenized for 1 min. Subsamples were taken for total N, ammonia N and VFA analyses. The remainder of the sample was lyophilized. Dry samples were analyzed for dry matter (DM), ash, neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF), and purine contents.

Bacterial cells were obtained from fermenter flasks on the last day of each experimental period. Solid and liquid associated bacteria were isolated using a combination of several detachment procedures (Whitehouse et al., 1994) selected to obtain the maximum detachment without affecting cell integrity. One hundred milliliters of a 2 g/L methylcellulose solution and small marbles (30 of 2 mm and 15 of 4 mm of diameter) were added to each fermenter and incubated in the same fermenter flasks at 39°C and mixed for 1 h to remove attached bacteria. After incubation, fermenter flasks were refrigerated for 24 h at 4°C. After this incubation, fermenter contents were agitated for 1 h to dislodge loosely attached bacteria. Finally, the fermenter content was filtered

through cheesecloth and washed with saline solution (8.5 g/L NaCl). Bacterial cells were isolated within 4 h by differential centrifugation at 1000 x g for 10 min to separate feed particles, and the supernatant was centrifuged at 20,000 x g for 20 min to isolate bacterial cells. Pellets were rinsed twice with saline solution and recentrifuged at 20,000 x g for 20 min. The final pellet was recovered with distilled water to prevent contamination of bacteria with ash. Bacterial cells were lyophilized and analyzed for DM, ash, N, and purine contents. Digestion of DM, OM, NDF, ADF and crude protein (CP), and flows of total, non-ammonia, microbial, and dietary N were calculated as described by Stern and Hoover (1990).

2.2.3. Chemical Analyses

Effluent DM was determined by lyophilizing 200 mL aliquots in triplicate. The DM content of diets and bacterial samples was determined by drying samples for 24 h in a 103°C forced air oven (AOAC, 1990; method 950.01). Dry samples of diets, effluents and bacteria were ashed overnight at 550°C in a muffle furnace (AOAC, 1990; method 942.05), and OM was determined by difference. Fibre components of diets and effluents were analyzed sequentially (Van Soest et al., 1991) using a thermostable alpha-amylase and sodium sulfite, and expressed without residual ash. Total N of diets, effluents and bacterial samples was determined by the Kjeldhal method (AOAC, 1990; method 976.05). Sample CP was calculated as N x 6.25. Effluent total CP was determined in liquid samples.

Large peptide and SPep+AA N were determined as described by Winter et al. (1964). To determine TCA N, 4 mL of a 500 g/L TCA solution were added to 16 mL of filtered fermenter fluid. After 4 h at 5°C, tubes were centrifuged at 9000 x g for 15 min. The supernatant was stored and frozen until analysed for TCA N by the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990; method 976.05). To determine TA N, 4 mL of a 100 g/L sodium tungstate solution and 4 mL of 1.07 N sulphuric acid were added to 16 mL sample of filtered fermenter fluid. After 4 h at 5°C, tubes were centrifuged at 9000 x g for 15 min. The supernatant was stored and frozen until it was analysed for TA N by the Kjeldahl procedure (AOAC, 1990; method 976.05).

Ammonia N and VFA analysis were analyzed as described in the first experiment.

Samples of lyophilized effluent and bacterial cells were analyzed for purine content (adenine and guanine) by HPLC as described Balcells et al. (1992), using allopurinol as the internal standard.

2.2.4. Statistical Analyses

All statistical analyses were conducted using SAS (version 8.1 SAS Institute, Inc., Cary, NC.). Results of VFA concentration and N fractions in fermenters were analyzed using the PROC MIXED for repeated measures (Littell et al., 1998). The model accounted for the effects of treatments and days (for VFA during the sampling days) or hours (for the N fractions during the sampling days) and the interaction of treatment with days or hours. The period was considered a random effect. The VFA concentration and N fractions were analyzed using the compound symmetric covariance structure that yielded the largest Schwarz's Bayesian criterion. The significance of differences between means of treatments compared with CTR were declared at $P < 0.05$ using the Dunnett option. Differences between each treatment and CTR for N fractions at each hour, and between 0 hours and 2, 4, and 6 hours within treatments were tested using the Bonferroni option, and declared at $P < 0.05$.

The results of nutrient digestion and flows were analyzed as a completely randomized block design. Main effects and its interactions were determined with the analysis of variance using the PROC MIXED of SAS. Differences between each treatment and CTR were tested using the Dunnett option and declared at $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

Experiment 1

The selection criteria to identify essential oils compounds with positive effects on rumen microbial fermentation were: an increase or no change in total VFA, a decrease in acetate proportion and an increase in propionate proportion. The positive changes in

ammonia N concentration were considered a decrease for dairy cattle diets, and an increase in beef cattle diets.

Essential oil compounds affected rumen microbial activity in both diets, but the effects were different depending on the dose and diet. The 5000 mg/L dose of all compounds resulted in lower total VFA concentration and, consequently, higher rumen pH in both diets, compared with CTR (Table 1 to 5). These results are consistent with their known antimicrobial activity, and agree with previous reports where essential oils have been supplied at similar doses and conditions (Evans and Martin, 2000; Cardozo et al., 2005). These doses were not select because of their negative effect on rumen microbial fermentation, and will not be discussed further. All other doses are presented by compound within diet.

Limonene is the most abundant monocyclic monoterpene in lemons (*Citrus limonum*), oranges (*Citrus aurantium*), grapefruit (*Citrus paradisi*), peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*) and others oils (Turner et al., 1999; Lückker et al., 2002). Dorman and Deans (2000) demonstrated the antimicrobial activity of limonene, mainly against gram negative bacteria. In the 60:40 forage to concentrate diet, 50 and 500 mg/L of limonene reduced total VFA concentration (-4.5 and -5.6%, respectively), suggesting that these doses were toxic to rumen bacteria. In addition, limonene at 500 mg/L also reduced ammonia N (-14.6%) and BCVFA (-6.6%) concentrations, suggesting the inhibition of the deamination of AA (Allison et al., 1962) (Table 1). In contrast, 5 mg/L of limonene did not modify rumen microbial fermentation. Oh et al. (1967) observed that limonene and others monoterpene hydrocarbons at 0.7-1.5 ml/L promoted slightly or had no effect on the activity of rumen microorganisms in sheep and deer. In the 10:90 forage to concentrate diet, with the exception of limonene at 50 mg/L that did not modify rumen microbial fermentation, limonene increased rumen pH, between 1.8 and 4.5%, without affecting other parameters. These results suggest that limonene may be interesting as modulator of pH in high concentrate fed beef cattle, but had little impact on modifying energy or N utilization.

Guaiacol is a compound of essential oils of peppermint (*Mentha piperita*), celery (*Apium graveolens*), birch (*Betula alba*) and juniper (*Juniperus communis*) oils, among others (Magyar et al., 2004). Different doses of guaiacol had negative effects on rumen

microbial fermentation (reduced VFA production) in the 60:40 forage to concentrate diet, except guaiacol at 500 mg/L. At this dose, guaiacol reduced the proportion of acetate (-2.5%) and ammonia N concentration (-16.7%) without reducing total VFA concentration (Table 2). It is not clear why the negative effects of guaiacol at 5 and 50 mg/L on total VFA concentration were not observed at 500 mg/L. In the 10:90 forage to concentrate diet, guaiacol had no negative effects on total and individual VFA concentrations. However, 5, 50 and 500 mg/L of guaiacol increased ammonia N concentration (13.8, 11.8 and 10.8%, respectively), and 5 mg/L of guaiacol also tended to increase ($P < 0.10$) rumen pH. The lowest dose of guaiacol (5 mg/L) could be interesting for beef cattle in a barley-beef system. In beef cattle fed high grain diets, increasing rumen available N may improve microbial protein synthesis and nutrient digestion (Devant et al., 2001). Although there are no other reports or information available on its effects on rumen microbial fermentation, guaiacol may be useful as a modulator of pH and protein degradation in high concentrate fed beef cattle.

Vanillin is the major constituent of vanilla beans, the fruit of an orchid (*Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona*, or *Vanilla tahitensis*) (Davidson and Naidu, 2000). Vanillin has strong antimicrobial properties against a number of bacteria, yeasts and moulds (Cerruti and Alzamora, 1996, Davidson and Naidu, 2000; Fitzgerald, et al., 2004). Recently, Fitzgerald et al. (2004) reported that the mode of action of vanillin on the inhibition of several food related bacteria was related to its membrane disrupting activity. In the 60:40 forage to concentrate diet, vanillin did not modify rumen microbial fermentation, with the exception of 500 mg/L that reduced the proportion of acetate (-2.0%) without affecting total VFA concentration (Table 3). Therefore, vanillin seems not to be a good alternative to improve rumen microbial fermentation in 60:40 forage to concentrate diets. In contrast, in the 10:90 diet all the doses of vanillin reduced the proportion of propionate (between 3.3 and 4.5%) and increased the acetate to propionate ratio (between 4.7 and 6.3%). The most interesting effect of vanillin was at 50 mg/L, where it increased total VFA (+13.5%), ammonia N (+43.1%) and BCVFA (+34.4%) concentration. Although this dose of vanillin may be interesting to increase VFA production and to increase ammonia N concentration in high concentrate fed beef cattle, the increase in the acetate to propionate ratio may limit its application.

Thymol is one of the major compounds of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) (Dorman and Deans, 2000). Several studies demonstrated that THY has a wide antimicrobial activity, inhibiting gram-positive and negative bacteria due to its capacity to act as membrane permeabilizer (Helander et al., 1998; Dorman and Deans, 2000; Walsh et al., 2003). In the 60:40 forage to concentrate diet, T500 reduced total VFA concentration (-28.5%), the proportion of propionate (-18.4%), ammonia N concentration (-31.9%) and BCVFA concentration (-41.7%), and increased the proportion of acetate (+1.8%), the acetate to propionate ratio (+35.5%) and rumen pH (+6.3%) (Table 4). The decrease in BCVFA and ammonia N concentration in T500 is consistent with the inhibition of the deamination process. In fact, McIntosh et al. (2003) observed that a blend of essential oils compounds containing THY reduced the rate of deamination of AA and inhibited the growth of *C. sticklandii* and *P. anaerobius*, two bacteria that belong to a specific group of hyper producing ammonia (HAP) species. Authors suggested that this blend of essential oils reduced ammonia N concentration by inhibiting HAP bacteria, a mechanisms of action similar to that of MON (Russell et al., 1988). Borchers et al. (1965) in the same batch cultures observed that 1000 mg/L of THY reduced ammonia N concentration, inhibiting amino acid deamination, which agrees with the reduce ammonia N concentration observed in T500. However, Borchers et al. (1965) did not study the effects of THY on VFA profile. The effects of THY on VFA profile agree with the results of Evans and Martin (2000), where 400 mg/L of THY resulted in a decrease in the acetate (-44.0%) and propionate (-78.2%) concentrations, and an increase on the acetate to propionate ratio (+61.4%). Evans and Martin (2000) also observed an increase in the final pH, which agrees with the increase rumen pH observed in T500. Moreover, Evans and Martin (2000) observed that THY at 90 and 180 mg/L inhibited the growth of *S. ruminantium*. and *S. bovis*, respectively, and suggested that THY disrupts membrane integrity and affects glucose transport. These results indicate that the adequate dose of THY may be somewhere between 50 and 500 mg/L, and further tests are required. In the 10:90 forage to concentrate diet, all doses of THY increased rumen pH, but only T5 and T50 did not affect other fermentation parameters. The T500 reduced total VFA (-27.1%) and BCVFA (-32%) concentrations, and the proportion of propionate (-24.8%), and increased the proportion of acetate (+6.4%) and the acetate to propionate ratio(+43.7%). In fact, only T5 and T50 had not negative effect on VFA production and these doses of THY may be useful as modulator of pH in high concentrate fed beef cattle.

Eugenol is one of the main compounds of clove (*Eugenia caryophyllata*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils (Davidson and Naidu, 2000), and has been shown to have antimicrobial activity against gram positive and gram negative bacteria (Dorman and Deans, 2000; Walsh et al., 2003; Gill et al., 2004). In the 60:40 forage to concentrate diet, E5, E50 and E500 modified N metabolism and VFA proportions without affecting total VFA concentration, but changes were dose dependent (Table 5). E5 tended ($P < 0.10$) to reduce the proportion of acetate (-1.7%) and the acetate to propionate ratio (-5.4%), and E50 tended ($P < 0.10$) to reduce and E500 reduced ammonia N concentration (-21.9 and -22.8%, respectively). E500 also reduced the proportion of propionate (-3.9%) and BCVFA concentration (-16.9%). The decrease in BCVFA and ammonia N concentration is consistent with the inhibition of the deamination of AA (Allison et al., 1962), and suggests that EUG may be an alternative for reducing ammonia N losses in the rumen. Tamminga (1992) suggested that controlling microbial degradation of protein in the rumen could reduce N losses and improve the low efficiency of N retention in ruminants. In the 10:90 forage to concentrate diet, E5 and E50 did not modify rumen microbial fermentation. However, E500 reduced total VFA concentration (-8.4%) and the proportion of propionate (-9.2%), and increased rumen pH (+6%), the proportion of acetate (+2.5%) and the acetate to propionate ratio (+15.4%). The effects of EUG were not positive for rumen microbial fermentation in the 10:90 forage to concentrate diet.

EUG was the most interesting essential oil compound in the 60:40 forage to concentrate diet. The treatment E5 tended to reduced the proportion of acetate and the acetate to propionate ratio, E50 tended to reduce ammonia N concentration, and E500 tended to reduce ammonia N concentration and the proportion of BCVFA concentration without affecting total VFA concentration, although at 500 mg/L also reduced the proportion of propionate. Guaiacol at 500 mg/L also reduce ammonia N concentration and the proportion of acetate in the 60:40 forage to concentrate diet. In the 10:90 forage to concentrate diet, limonene at 5, 500 and 5000 mg/L, THY at 5 and 50 mg/L and guaiacol at 5 mg/L increased rumen pH without affecting other fermentation parameters. Although vanillin at 50 mg/L increased total VFA, ammonia N and BCVFA concentrations, and it also increased the acetate to propionate ratio.

Table 1. Effect of limonene on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets.

Diet	60:40						10:90					
	Dose	0	5	50	500	5000	SEM ¹	0	5	50	500	5000
pH	6.46	6.49	6.50	6.50	6.60 [†]	0.06	5.50	5.60*	5.55	5.73*	5.77*	0.02
NH ₃ , mg/100mL	21.9	20.8	20.6	18.7*	20.6	1.08	16.9	18.3	18.2	19.2	19.1	0.54
Total VFA, mM	140.4	136.9	134.1*	132.5*	126.2*	2.44	124.1	122.5	128.7	111.9	117.2	6.53
Acetate, mol/ 100 mol	64.9	64.3	63.9	64.6	63.7*	0.40	59.1	60.0	59.5	60.4	58.7	0.67
Propionate, mol/ 100 mol	20.6	20.8	20.9	20.9	21.0	0.25	23.8	23.0	23.5	21.7	22.1	0.98
Butyrate, mol/ 100 mol	10.5	10.8	11.0	10.4	10.7	0.19	13.3	13.2	13.3	13.9	14.5	0.60
BCVFA ² , mM	3.00	3.05	2.96	2.80*	2.95	0.08	2.53	2.56	2.66	2.33	2.62	0.17
A:P	3.55	3.40	3.40	3.40	3.36*	0.06	2.79	2.97	2.89	3.57	2.98	0.43

¹SEM: standard error of the mean.

²BCVFA: Branch-chained VFA.

* Means within a column differ from control ($P < 0.05$).

[†] Means within a column differ from control ($P < 0.10$).

Table 2. Effect of guaiacol on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets.

Diet	60:40						10:90					
Dose	0	5	50	500	5000	SEM ¹	0	5	50	500	5000	SEM ¹
pH	6.14	6.28	6.26	6.19	6.59*	0.08	5.29	5.35 [†]	5.32	5.26	5.99*	0.02
NH ₃ , mg/100mL	31.2	21.4*	22.9*	26.0*	22.4*	4.05	19.5	22.2*	21.8*	21.6*	21.9*	0.58
Total VFA, mM	152.8	132.1*	131.4*	141.0	105.2*	7.64	130.3	130.6	128.6	127.3	93.2*	3.66
Acetate, mol/ 100 mol	64.2	62.9 [†]	62.8 [†]	62.6*	62.8*	0.53	57.8	58.5	58.2	57.3	59.9 [†]	0.82
Propionate, mol/ 100 mol	20.3	22.1	22.0	21.3	19.4	0.86	24.2	23.4	23.6	23.9	20.7*	0.36
Butyrate, mol/ 100 mol	11.1	10.9	10.9	11.6	13.6	0.32	13.9	13.9	13.9	14.5	15.5	0.78
BCVFA ² , mM	3.77	2.87 [†]	2.91 [†]	3.35	2.27*	0.35	2.85	2.99	2.95	2.99	2.30*	0.10
A:P	3.31	2.89	2.90	3.03	3.51	0.22	2.55	2.64	2.59	2.53	3.04*	0.06

¹SEM: standard error of the mean.

²BCVFA: Branch-chained VFA.

* Means within a column differ from control ($P < 0.05$).

[†] Means within a column differ from control ($P < 0.10$).

Table 3. Effect of vanillin on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets.

Diet	60:40						10:90						
	Dose	0	5	50	500	5000	SEM ¹	0	5	50	500	5000	SEM ¹
pH		6.14	6.15	6.13	6.11	6.40*	0.04	5.29	5.32	5.30	5.28	5.82*	0.03
NH ₃ , mg/100mL		31.2	32.3	32.8	32.6	26.3*	1.79	19.5	22.3	27.9*	23.1	24.2	2.38
Total VFA, mM		152.8	156.9	153.6	148.3	115.4*	3.86	130.3	133.0	147.9 [†]	134.8	96.6*	7.30
Acetate, mol/ 100 mol		64.2	64.0	63.5	62.9*	61.2*	0.47	57.8	58.8	58.4	58.5	58.5	0.71
Propionate, mol/ 100 mol		20.3	20.4	20.4	20.7	20.9*	0.33	24.2	23.4 [†]	23.1*	23.3*	21.0*	0.34
Butyrate, mol/ 100 mol		11.1	11.1	11.5	11.6	13.0	0.22	13.9	13.7	14.0	13.9	15.3	0.40
BCVFA ² , mM		3.77	4.00	4.12	3.99	2.93*	0.22	2.85	3.06	3.83*	3.22	2.72	0.29
A:P		3.31	3.28	3.27	3.20	3.12*	0.06	2.55	2.67*	2.71*	2.67*	2.95*	0.04

¹SEM: standard error of the mean.

²BCVFA: Branch-chained VFA.

* Means within a column differ from control ($P < 0.05$).

[†] Means within a column differ from control ($P < 0.10$).

Table 4. Effect of thymol on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets.

Diet	60:40						10:90					
	Dose	0	5	50	500	5000	SEM ¹	0	5	50	500	5000
pH	6.46	6.50	6.47	6.87*	7.38*	0.06	5.50	5.65*	5.65*	6.32*	6.86*	0.03
NH ₃ , mg/100mL	21.9	21.8	21.5	14.9*	9.34*	1.17	16.9	16.9	18.5	14.7	9.25*	1.04
Total VFA, mM	140.4	147.6	138.3	100.4*	64.9*	7.31	124.1	126.3	125.9	90.5*	64.8*	6.31
Acetate, mol/ 100 mol	64.9	64.8	64.1	66.7*	64.5	0.37	59.1	59.6	59.4	62.9*	64.1*	0.56
Propionate, mol/ 100 mol	20.6	20.7	20.9	16.8*	21.2*	0.17	23.8	23.3	23.3	17.9*	21.6	1.04
Butyrate, mol/ 100 mol	10.5	10.6	10.9	13.2	10.6	0.21	13.3	13.3	13.5	15.0	10.6	0.81
BCVFA ² , mM	3.02	3.10	2.98	1.76*	1.29*	0.14	2.53	2.56	2.60	1.72*	1.28*	0.18
A:P	3.55	3.55	3.47	4.81*	3.38	0.31	2.79	2.89	2.88	4.01*	3.31	0.36

¹SEM: standard error of the mean.

²BCVFA: Branch-chained VFA.

* Means within a column differ from control ($P < 0.05$).

Table 5. Effect of eugenol on pH, ammonia N and total and individual VFA concentrations in in vitro fermentation of 60:40 and 10:90 forage to concentrate diets.

Diet	60:40						10:90						
	Dose	0	5	50	500	5000	SEM ¹	0	5	50	500	5000	SEM ¹
pH		6.46	6.42	6.43	6.56	7.35*	0.08	5.50	5.52	5.51	5.83*	6.78*	0.06
NH ₃ , mg/100mL		21.9	19.9	17.1 [†]	16.9 [†]	10.4*	1.94	16.9	15.6	16.6	16.9	10.6*	1.53
Total VFA, mM		140.4	134.8	137.0	133.4	66.1*	3.95	124.1	129.2	126.2	113.7*	65.1*	3.40
Acetate, mol/100 mol		64.9	63.8 [†]	64.0	65.1	64.7	0.46	59.1	59.1	59.2	60.6*	64.1*	0.40
Propionate, mol/100 mol		20.6	21.0	20.9	19.8*	21	0.29	23.8	23.7	23.8	21.6*	21.4*	0.33
Butyrate, mol/100 mol		10.5	11.0	10.9	11.3	10.5	0.36	13.3	13.4	13.3	13.8	10.5	0.60
BCVFA ² , mM		3.02	3.03	3.01	2.51*	1.31*	0.08	2.53	2.56	2.54	2.33	1.27*	0.10
A:P		3.55	3.36 [†]	3.38	3.66	3.45	0.08	2.79	2.81	2.80	3.22*	3.35*	0.10

¹SEM: standard error of the mean.

²BCVFA: Branch-chained VFA.

* Means within a column differ from control ($P < 0.05$).

[†] Means within a column differ from control ($P < 0.10$).

Experiment 2

Monensin, THY and EUG were selected for the second experiment. Monensin is widely used to improve the efficiency of feed utilization in cattle, decreasing ammonia production and the acetate to propionate ratio (Russell and Strobel, 1989), and was used as a positive control. Thymol is one of the major essential oil component of thyme and oregano, and has received most attention from researchers (Lambert et al., 2001; Bagamboula et al., 2004). And the first experiment showed that EUG was the most interesting essential oil compound in in vitro 24 h batch incubation in the 60:40 forage to concentrate diet.

Monensin reduced the digestion of DM and OM, which is explained by the reduction of NDF and ADF digestion (Table 6). The negative effects of MON on diet digestion agree with some in vitro studies in which MON at 2 to 33 mg/L reduced DM and OM digestion (Wallace et al., 1980; Wallace et al., 1981) and fiber digestion (Russell and Strobel, 1988). However, in vivo studies with low doses (2 to 5 mg/L) of MON did not affect nutrient digestion, suggesting that a dose of 10 mg/L may be toxic to rumen bacteria. This effect of MON on NDF and ADF digestion is attributed to the inhibition of ruminal cellulolytic bacteria, as cellulolytic ruminococci and *Butyrivibrio fibrisolvens*, which are particularly sensitive to ionophores (Russell and Strobel, 1989). Monensin reduced the proportion of acetate and butyrate, BCVFA concentration and the acetate to propionate ratio, and increased the proportion of propionate compared with CTR, as expected, without affecting total VFA concentration (Table 7). Results of this experiment agree with in vitro and in vivo studies that reported that monensin supplementation maintained total VFA concentration, increased the proportion of propionate and reduced the proportion of acetate and butyrate in ruminal fluid (Russell and Strobel, 1988; Yang and Russell, 1993), although some studies also reported that the addition of monensin increased total VFA concentration (Richardson et al., 1976).

Thymol at 500 mg/L acted as MON, reducing the digestion of DM and OM as a result of the reduction of NDF and ADF digestion (Table 6). Thymol at 500 mg/L also reduced total VFA concentration, the proportion of acetate and valerate, BCVFA concentration and the acetate to propionate ratio, and increased the proportion of propionate and butyrate compared with CTR. These negative effects of T500 on nutrient

digestion agree with the results of the first experiment where THY at 500 and 5000 mg/L reduced total VFA production and increased rumen pH, and with Evans and Martin (2000), where THY (400 mg/L) also reduced total VFA production and inhibited the growth of gram-negative and positive bacteria. Thymol and MON caused the same negative effects on nutrient digestion, suggesting that THY could also act on cellulolytic species. Thymol at 50 mg/L had no effect on VFA profile. However, the lowest dose of THY (T5) tended to reduce ($P < 0.10$) the proportion of acetate and increased the proportion of butyrate without affecting total VFA concentration and diet fermentation (Table 7). These results suggest that the selection of the optimal dose may require further studies with doses between 5 to 50 mg/L and from 50 to 500 mg/L, to observe the same positive effects without affecting total VFA concentration.

Table 6. Effect of monensin, thymol and eugenol on dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) digestion in a dual flow continuous culture.

	Treatments ¹								SEM ²
	CTR	MON	T5	T50	T500	E5	E50	E500	
True digestibility, %									
DM	51.0	43.8*	53.1	52.4	43.1*	49.4	53.9	51.4	1.97
OM	49.3	43.2*	49.7	49.9	39.2*	48.6	51.2	48.1	1.61
NDF digestibility, %	20.1	-0.48*	18.4	21.7	-1.96*	23.0	18.7	12.3	6.15
ADF digestibility, %	27.8	-0.94*	27.8	31.3	0.48*	31.3	30.4	20.1	5.86

¹CTR = control; T5 = 5 mg/L of thymol; T50 = 50 mg/L of thymol; T500 = 500 mg/L of thymol; E5 = 5 mg/L of eugenol; E50 = 50 mg/L of eugenol; E500 = 500 mg/L of eugenol; MON = 10 mg/L of monensin.

²SEM: standard error of the mean.

* Means within a row differ from control ($P < 0.05$).

Eugenol had no effect on DM, OM, NDF, and ADF digestion, which suggests that it did not modify overall diet fermentability (Table 6). Although, EUG had no effect on nutrient digestion, E500 reduced total VFA concentration, the proportion of acetate, BCVFA concentration and the acetate to propionate ratio, and increased the proportion of propionate, butyrate and valerate compared with CTR (Table 7). In contrast, in the first experiment E500 in the 60:40 forage to concentrate diet reduced the proportion of

propionate and had no negative effect on total VFA concentration. These results and others studies (Cardozo et al., 2004; Castillejos et al., 2005) suggest that effects from short term fermentation studies should be interpreted with caution because a longer adaptation time may be required to observe real effects on rumen microbial fermentation.

Table 7. Effect of monensin, thymol and eugenol on total volatile fatty acid (VFA) concentration and profile in a dual flow continuous culture.

	Treatments ¹								SEM ²
	CTR	MON	T5	T50	T500	E5	E50	E500	
Total VFA, mM	105.5	103.7	102.5	103.9	52.8*	106.9	101.2	90.15*	4.32
VFA, mol/100 mol									
Acetate	69.9	48.9*	65.6 [†]	67.5	51.6*	69.6	67.6	58.3*	1.50
Propionate	15.8	42.3*	16.9	16.7	20.0*	15.1	17.0	22.9*	1.24
Butyrate	9.01	4.69*	11.7*	10.0	25.6*	8.87	10.4	14.4*	0.88
Valerate	2.79	3.13	2.70	2.74	2.50*	2.84	2.78	3.73*	0.26
Iso-Butyrate	0.61	0.49	0.64	0.65	0.19*	0.67	0.53	0.34*	0.07
Iso-Valerate	2.16	0.44*	2.15	2.36	0.02*	2.95	1.63	0.28*	0.49
BCVFA ³ , mM	2.96	0.97*	2.86	3.10	0.11*	3.84	2.20	0.54*	0.57
Acetate:Propionate	4.42	1.16*	3.92	4.05	2.58*	4.62	4.02	2.57*	0.31

¹CTR = control; T5 = 5 mg/L of thymol; T50 = 50 mg/L of thymol; T500 = 500 mg/L of thymol; E5 = 5 mg/L of eugenol; E50 = 50 mg/L of eugenol; E500 = 500 mg/L of eugenol; MON = 10 mg/L of monensin.

²SEM: standard error of the mean.

³BCVFA: Branch-chained VFA.

* Means within a row differ from control ($P < 0.05$).

[†] Means within a row differ from control ($P < 0.10$).

The highest dose of THY and EUG, and MON reduced the proportion of acetate, BCVFA concentration and the acetate to propionate ratio, and increased the proportion of propionate. However, while T500 and E500 increased the proportion of butyrate, MON reduced it. The fermentation pattern observed in essential oils compounds is different to the pattern observed in MON, suggesting that the mechanism of action of essential oils compounds may not be the same than that of MON. In fact, Helander et

al. (1998) observed that monensin affects only some gram positive bacteria, while essential oils inhibit gram positive and gram negative bacteria. Ruminal gram positive bacteria are involved in fermentation processes that produce, among other end products, acetate, butyrate, formate, lactate, hydrogen, and ammonia. On the other hand, ruminal gram negative bacteria are involved in fermentation processes associated with the production of propionate and succinate (Russell and Strobel, 1989). MON reduced the proportion of butyrate because this additive inhibits the major butyrate producer, the ruminal gram positive bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* (Russell and Strobel 1989). Moreover, T500 reduced the proportion of valerate and E500 increased it, suggesting that each essential oil compound may have a different mechanism of action. Essential oils comprise a large number of components and it is likely that their mode of action involves several targets in the bacterial cell.

Ammonia N concentration, the flow of ammonia, non-ammonia, bacterial and dietary N, the degradation of CP and efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) were not affected by treatments (Table 8).

Table 8. Effect of monensin, thymol and eugenol on N metabolism of ruminal microorganisms in a dual flow continuous culture.

	Treatments ¹								SEM ²
	CTR	MON	T5	T50	T500	E5	E50	E500	
N-NH ₃ , mg/100 mL	9.38	11.3	10.7	10.9	9.31	10.0	6.81	10.9	1.91
N Flow, g/d									
Ammonia	0.30	0.36	0.34	0.34	0.29	0.31	0.22	0.35	0.06
Non-Ammonia	3.85	3.78	3.76	3.74	3.72	3.73	3.90	3.84	0.14
Bacterial	1.45	1.04	1.49	1.36	1.25	1.25	1.37	1.30	0.17
Dietary	2.40	2.73	2.27	2.38	2.47	2.47	2.53	2.54	0.21
CP Degradation, %	26.5	16.4	30.5	27.2	24.4	24.5	22.7	22.5	6.48
EMPS ³	30.0	24.6	30.7	27.9	32.5	26.4	27.5	27.2	3.27

¹CTR = control; T5 = 5 mg/L of thymol; T50 = 50 mg/L of thymol; T500 = 500 mg/L of thymol; E5 = 5 mg/L of eugenol; E50 = 50 mg/L of eugenol; E500 = 500 mg/L of eugenol; MON = 10 mg/L of monensin.

²SEM: standard error of the mean.

³EMPS: Efficiency of microbial protein synthesis (g bacterial N /kg organic matter truly digested).

However, the average concentration of LPep N was higher in T5, T500 and E500 (Table 9), suggesting that proteolysis was stimulated or peptidolysis was inhibited. T500 also increased the average concentration of SPep+AA N. The accumulation of LPep N and SPep+AA N suggest that proteolysis and peptidolysis were stimulated by T500. However, deamination was not affected because the average concentration of ammonia N was similar in all treatments (average of 12.1 mg/100mL), and only MON unexpectedly tended to increase this fraction. In contrast, most in vitro studies reported that monensin decreased (Van Nevel and Demeyer, 1977; Russell and Strobel, 1988) ruminal ammonia concentration, decreasing the deamination of AA. Russell et al. (1988) found a group of gram positive bacteria which are monensin sensitive, called hyper-ammonia producing bacteria, that have a high specific activity for ammonia production. Although, T500, E500 and MON reduced BCVFA concentration, these treatments did not reduce ammonia N concentration as expected, because the decrease of BCVFA concentration is a consequence of the inhibition of the deamination process of branch chained AA (Allison et al., 1962).

Table 9. Effect monensin, thymol and eugenol on N fraction concentrations.

	Treatments ¹								
	CTR	MON	T5	T50	T500	E5	E50	E500	SEM ²
N fractions, mg/100 mL									
LPep N	5.14	6.49	7.49*	6.67	7.23*	6.53	6.42	7.25*	0.75
SPep+AA N	4.86	4.15	3.73	5.05	9.66*	4.46	4.07	4.97	0.61
Ammonia N	11.7	16.9 [†]	13.4	14.0	10.7	13.7	9.45	11.6	1.97

¹CTR = control; T5 = 5 mg/L of thymol; T50 = 50 mg/L of thymol; T500 = 500 mg/L of thymol; E5 = 5 mg/L of eugenol; E50 = 50 mg/L of eugenol; E500 = 500 mg/L of eugenol; MON = 10 mg/L of monensin.

²SEM: standard error of the mean.

* Means within a row differ from control ($P < 0.05$).

[†] Means within a row differ from control ($P < 0.10$).

4. Conclusion

The addition of different doses of EUG, guaiacol, limonene, THY and vanillin in in vitro rumen microbial fermentations of beef and dairy diets may affect rumen microbial

activity, modifying the fermentation profile and N metabolism of rumen microbes. These essential oil compounds had different effects depending on fermentation conditions. Compounds and doses were selected considering an increase or no change in total VFA production, changes in the acetate to propionate ratio and a decrease or an increase in ammonia N concentration depending on the type of diet. Most essential oil compounds had an important antimicrobial activity decreasing total VFA concentration, although at appropriate dose these compounds also modified rumen microbial fermentation without decreasing total VFA concentration. In the 60:40 forage to concentrate diet, EUG and guaiacol in batch fermentation reduced ammonia N concentration and/or changed VFA proportions. In the 10:90 forage to concentrate diet, most doses of limonene and the lowest doses of guaiacol and THY acted as modulator of pH in batch fermentation, and most doses of vanillin changed the proportions of VFA. In continuous culture, MON also changed the proportions of VFA as expected but inhibited nutrient digestion. EUG and THY decreased total VFA concentration and changed VFA proportions, and only the lowest dose of THY modified fermentation profile without decreased total VFA concentration and diet fermentation. Further research is required to define the optimal dose and effects of these essential oils compounds on rumen microbial fermentation.

6. References

- Allison, M. J., M. P. Bryant, and R. N. Doestch. 1962. Studies on the metabolic function of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci. I. Incorporation of isovalerate into leucine. *J. Bacteriol.* 83: 523-532.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.
- Bagamboula, C. F., M. Uyttendaele, and J. Debevere. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 21:33-34.
- Balcells, J., J. A. Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575:153-157.
- Borchers, R. 1965. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. *J. Anim. Sci.* 24:1033-1038.
- Cardozo, P., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2004. Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profile in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82:3230-3236.
- Cardozo, P.W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2005. Screening for the effects at two pH levels on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate beef cattle diet. *J. Anim. Sci.* (submitted).
- Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret, and R. Losa. 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:29-41.
- Cerruti, P., and S. M. Alzamora. 1996. Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. *Int. J. Food Microbiol.* 29:379-386.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Cosentino, S., C. I. G. Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi, and F. Palmas. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:130-135.

- Davidson, P. M., and A. S. Naidu. 2000. Phyto-phenols. In: Natural food antimicrobial systems, 265-293. Naidu, A. S., eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, and J. Gasa. 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:1944-1953.
- Dorman, H. J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.
- Evans, J. D., and S. A. Martin. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.* 41:336-340.
- Fitzgerald, D. J., M. Stratford, M. J. Gasson, J. Ueckert, A. Bos, and A. Narbad. 2004. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *J. Appl. Microbiol.* 97:104-113.
- Gill, A. O., and R. A. Holley. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5750-5755.
- Guillén, M. D., and M. J. Manzanos. 1998. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. *Plant. Food Chem.* 63:373-383.
- Helander, I. M., H-L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, and A. Von Wright. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46:3590-3595.
- Hoover, W. H., B. A. Crooker, and C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:528-534.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliments.* 2:131-144.
- Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, P. J. Coote, and G.-J. E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91:453-462.
- Littell, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 75:1216-1231.

- Lüchker, J., M. K. El Tammer, W. Schwab, F. W. A. Verstappen, L. H. W. van der Plas, H. J. Bouwmeester and H. A. Verhoeven. 2002. Monoterpenes biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *Eur. J. Biochem.* 269:3160-3171.
- Magyar, J., N. Sxentandrassy, T. Bányász, L. Fülöp, A. Varró, P. P. Nánási. 2004. Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 487:29-36.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99-109.
- McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, and C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5011-5014.
- National Research Council, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle (7th rev. Ed). National Academy Press., Washington, DC.
- Oh, H. K., T. Sakai, M. B. Jones, and W. M. Longhurst. 1967. Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Appl. Microbiol.* 15:777-784.
- Richardson, L. F., A. P. Raun, E. L. Potter, C. O. Cooley, and R. P. Rathmacher. 1976. Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. *J. Anim. Sci.* 43: 657-664.
- Russell, J. B., H. J. Strobel, and G. Chen. 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:872-877.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1988. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. *J. Anim. Sci.* 66:552-558.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1-6.
- Smith-Palmer, A., J. Stewart and, L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:118-122.
- Statistical Analysis Systems (SAS) Institute, 1989. SAS User's Guide. SAS Institute, Cary, NC.

- Stern, M. D., and W. H. Hoover. 1990. The dual flow continuous culture system. Pages 17-32 in Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or fermentation. Northeast ADSA-ASAS Regional meeting, Chazy, NY.
- Tamminga, S. 1992. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.* 75:345-357.
- Thompson, D. P. 1986. Effect of essential oils on spore germination of *Rhizopus*, *Mucor* and *Aspergillus* species. *Mycologia.* 78:482-485.
- Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Brit. Grassland Soc.* 18:104-111.
- Turner, G., J. Gershenzon, E. E. Nielson, J. E. Froehlich, and R. Croteau. 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiol.* 120:879-886.
- Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer. 1977. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:251-257.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Voda, K, B. Boh, M. Vrtacnik, and F. Pohleven. 2003. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora putana*. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 51:51-59.
- Walsh, S. E., J.-Y. Maillard, A. D. Russell, C. E. Catrenith, D. L. Charbonneau, and R. G. Bartolo. 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on gram-positive and -negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94:240-247.
- Wallace, R. J., K.-J. Cheng, and J. W. Czerkawski. 1980. Effect of monensin on fermentation characteristics of the artificial rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:672-674.
- Wallace, R. J., J. W. Czerkawski, and G. Breckenridge. 1981. Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 46:131-148.
- Weller R. A., and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32:341-352.

- Whitehouse, N. L., V. M. Olson, C. G. Schwab, W. R. Chesbro, K. D. Cunningham, and K. D. Lycos. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72: 1335-1343.
- Winter, K. A., R. R. Johnson, and B. A. Dehority. 1964. Metabolism of urea nitrogen by mixed cultures of rumen bacteria grown on cellulose. *J. Anim. Sci.* 97:793-797.
- Yang, C.-M. J., and J. B. Russell. 1993. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.* 71:3470-3476.
- Youdim, K. A., and S. G. Deans. 1999. Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. *Mech. Ageing Dev.* 109:163-175.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Esta tesis forma parte del proyecto FEDER 2FD1997-2262 titulado “Determinación de las condiciones óptimas de uso de los aceites esenciales como aditivos para mejorar la utilización del nitrógeno a nivel ruminal y reducir las pérdidas de nitrógeno al medio ambiente”. El objetivo inicial de este proyecto fue optimizar el metabolismo ruminal para conseguir mejorar la utilización del N a nivel ruminal reduciendo sus pérdidas al medio ambiente mediante el estudio de los efectos de una mezcla de compuestos de aceites esenciales: el producto comercial CRINA para rumiantes de la empresa AKZO NOBEL, SA.

Los resultados de trabajos preliminares realizados en nuestro departamento (Molero *et al.*, 2004), así como algunas evidencias del Rowett Research Institute (Newbold *et al.*, 1999), indicaban que el uso de este producto comercial resultaba en una reducción de la degradación proteica ruminal. Este efecto sobre el metabolismo nitrogenado ruminal se apoyaba en la hipótesis de que este aditivo antimicrobiano actuaba de forma selectiva sobre poblaciones microbianas específicas. Aunque el mecanismo de acción de los aceites esenciales y de sus compuestos se desconoce en un ecosistema ruminal, Newbold *et al.* (1999) sugirieron que este aditivo actuaba inhibiendo la degradación proteica ruminal de algunos suplementos proteicos y reducía la concentración de nitrógeno amoniacal mediante la inhibición de un grupo bacteriano con elevada actividad específica desaminadora llamado bacterias hiperproductoras de amoníaco (HAP). Estudios posteriores en el Rowett Research Institute, confirmaron la inhibición de la desaminación y la sensibilidad de las bacterias HAP hacia este aditivo (McIntosh *et al.*, 2003).

Paralelamente al objetivo inicial de este proyecto, surge la necesidad de desarrollar nuevos aditivos de origen natural, para optimizar la utilización de nutrientes en el rumiante, derivada de la prohibición de algunos antibióticos promotores del crecimiento, utilizados hasta entonces como aditivos en producción animal (Reglamento 1831/2003/CE). Los efectos deseados para los nuevos aditivos, como los aceites esenciales y sus compuestos, serán los efectos de la monensina, uno de los promotores

de crecimiento prohibidos en Europa, que mejora la eficiencia de producción mediante la modificación de la relación acetato:propionato y el control de la producción de amoníaco ruminal inhibiendo al grupo bacteriano HAP (Wallace, 1996).

En el primer estudio se utilizaron 8 fermentadores (1320 ml) de doble flujo continuo para estudiar el efecto de la mezcla de compuestos de aceites esenciales (BEO) sobre la fermentación microbiana y el flujo de nutrientes, y su interacción con dos raciones típicas de vacuno lechero y vacuno de carne. No se encontraron interacciones entre el tipo de ración y la adición de BEO. La adición de BEO incrementó la concentración de AGV totales sin modificar las proporciones individuales de AGV, el metabolismo nitrogenado y el flujo de nutrientes. La falta de efectos sobre el metabolismo nitrogenado se atribuyó a varios factores experimentales:

- a) La dosis recomendada podía no ser la adecuada para las condiciones utilizadas en nuestro sistema *in vitro*. Además, mediante la revisión bibliográfica de otros aditivos ruminales encontramos la dificultad de comparar los resultados, ya que dependiendo de la metodología utilizada (*in vivo* o *in vitro*), el cálculo de la dosis del aditivo puede basarse en la ración (mg de aditivo/kg de MS de la ración) o estar basado en el volumen del sistema *in vitro* (mg de aditivo/l de líquido ruminal), y en ambos casos las unidades resultan ser ppm pero con resultados numéricamente muy diferentes. Inicialmente se utilizó la dosis comercial del producto en base a mg/kg de ración. Sin embargo, la mayoría de estudios *in vitro* calculan la dosis de acuerdo al volumen ruminal utilizado. La dosis utilizada en nuestro estudio fue de 5 mg/d de BEO calculados en base a la ración, que equivaldrían a 1.5 mg/l en nuestro sistema *in vitro*, y la dosis comercial recomendada calculada en base a volumen ruminal debería ser de 5 mg/l de BEO, cuatro veces superior. Estas discrepancias se deben a las diferencias en la relación de MS ingerida por el animal respecto a su volumen ruminal, y el aporte de MS a los fermentadores respecto a su volumen total, que es inferior.
- b) Según algunos estudios, el periodo de adaptación de la microflora del líquido ruminal al aditivo podría influir en los efectos sobre la fermentación ruminal, y los 6 d de adaptación de un sistema de doble flujo continuo no serían suficientes (Wallace *et al.*, 2003; Molero *et al.*, 2004);

- c) Además, Attwood *et al.* (1998) observaron que el líquido ruminal de oveja (11.6%) tenía una concentración superior de bacterias HAP que el líquido ruminal de vaca (11.6 vs 5.2 %, respectivamente). La mayoría de experimentos previos con BEO donde se observaron efectos sobre el metabolismo nitrogenado utilizaron líquido ruminal de ovejas canuladas (Newbold *et al.*, 1999; McIntosh *et al.*, 2000; McEwan *et al.*, 2002 a, b; Wallace *et al.*, 2002). Tal vez, la baja concentración de bacterias HAP del líquido ruminal de vaca, utilizado en nuestro estudio, podría explicar la falta de efectos sobre el metabolismo nitrogenado de BEO, si este fuera su principal mecanismo de acción.

El segundo estudio se diseñó para abordar la primera hipótesis, con el objetivo de determinar el efecto de diferentes dosis de BEO sobre el metabolismo nitrogenado y el perfil de fermentación; y por otro lado, estudiar el efecto del periodo de adaptación de los microorganismos ruminales a la adición de BEO. En el estudio de la dosis de BEO en cultivo continuo con líquido ruminal de vaca de leche, volvimos a confirmar los efectos de BEO sobre el perfil de fermentación. BEO a 5 mg/l (dosis recomendada calculada en base a volumen ruminal) incrementó la concentración de AGV totales, la proporción de acetato y la relación acetato:propionato, e inhibió la proporción de propionato y valerato. Los efectos sobre el metabolismo nitrogenado fueron poco relevantes. Las dosis 50 y 500 mg/l de BEO no modificaron ni el perfil de fermentación ni el metabolismo nitrogenado ruminal.

Con el objetivo de determinar la importancia del tiempo de adaptación del líquido ruminal al aditivo se diseñó una prueba experimental utilizando ovejas de engorde adaptadas a BEO durante 28 d. De nuevo, volvimos a observar los efectos de BEO sobre el perfil de fermentación, la proporción de acetato y la relación acetato:propionato aumentaron, y la proporción de propionato y isovalerato, y la concentración de AGV ramificados disminuyeron en el líquido ruminal de ovejas adaptadas a BEO. Sin embargo, en este estudio la adición de 5 mg/l de BEO disminuyó la concentración de N amoniacal (-14%) en el líquido ruminal adaptado durante 28 d. Concluimos que los efectos sobre el perfil de fermentación son visibles con 6 d de adaptación a BEO, pero los cambios sobre el metabolismo nitrogenado sólo aparecieron en el líquido ruminal de ovejas alimentados con BEO durante 28 d.

Finalizado el estudio de la mezcla comercial de compuestos de aceites esenciales decidimos estudiar el efecto de una serie de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son principios activos de esta mezcla, para determinar el mecanismo de acción y los efectos de estos compuestos sobre la fermentación microbiana ruminal. En la primera prueba experimental se estudiaron los efectos de 5 compuestos de aceites esenciales variando las condiciones de fermentación en incubaciones in vitro de 24 h. Se observó una gran variabilidad de resultados entre compuestos y dosis dependiendo de las condiciones del cultivo de fermentación (ración y pH). Sin embargo, se confirmó la capacidad antimicrobiana de la mayoría de los compuestos de aceites esenciales sobre un ecosistema microbiano ruminal. Se observó una disminución de la fermentación a dosis elevadas, incrementando el pH final de la fermentación y reduciendo la concentración total de AGV. Los efectos del eugenol en una ración con alto contenido en forraje fueron los más interesantes. Sin embargo, el timol ha sido el compuesto de aceites esenciales más estudiado, por lo que los compuestos eugenol y timol se seleccionaron para una segunda prueba experimental. De nuevo, se utilizaron los 8 fermentadores de doble flujo continuo para estudiar el efecto de tres dosis de eugenol y timol, y una dosis de monensina utilizada como control positivo. De este estudio se concluyó que únicamente la dosis más baja de timol modificó el perfil de fermentación sin inhibir la concentración total de AGV ni la fermentación de los nutrientes.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES GENERALES

Los estudios realizados sobre los efectos de una mezcla de compuestos de aceites esenciales y los efectos de compuestos fenólicos de aceites esenciales sobre la fermentación microbiana ruminal en sistemas in vitro permiten concluir, bajo las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo la presente Tesis Doctoral, que:

1. La adición de la mezcla de compuestos de aceites esenciales (1.5 mg/l) a un sistema in vitro de fermentación ruminal de doble flujo continuo incrementó la concentración total de AGV tanto en raciones con alto contenido en forraje como con alto contenido en concentrado, sugiriendo una mejora en la fermentabilidad de la ración.
2. La adición de la mezcla de compuestos de aceites esenciales no modificó las proporciones individuales de AGV, la digestibilidad de los nutrientes, ni el metabolismo nitrogenado, lo que descartó un efecto nocivo del aditivo a la dosis empleada frente la fermentación ruminal. Sin embargo, la falta de efectos sobre el metabolismo nitrogenado se atribuyó a una dosis inadecuada y/o a un periodo de adaptación insuficiente.
3. Una dosis de 5 mg/l de la mezcla de compuestos de aceites esenciales, calculada de acuerdo al volumen ruminal del sistema in vitro de fermentación ruminal de doble flujo continuo, incrementó la concentración total de AGV, la proporción de acetato y la relación acetato:propionato, y disminuyó la proporción de propionato y valerato, y la concentración de nitrógeno de péptidos grandes. Sin embargo, dosis superiores del aditivo no modificaron el perfil de fermentación ni el metabolismo nitrogenado.
4. Cuando el periodo de adaptación del líquido ruminal se extendió a 4 semanas en ovejas alimentadas con la mezcla de aceites esenciales, el aditivo continuó incrementando la concentración de acetato y la relación acetato:propionato, y disminuyendo la proporción de propionato. Sin embargo, el aditivo también consiguió reducir la concentración de N amoniacal y los AGV ramificados, sugiriendo una inhibición de la desaminación.

5. El efecto de la mezcla de aceites esenciales sobre la concentración y el perfil de AGV se mostró en periodos de adaptación relativamente cortos (6 días). Sin embargo, los efectos del aditivo sobre el metabolismo nitrogenado aparecieron con periodos de adaptación de 4 semanas.
6. La adición de eugenol, guaiacol, limoneno, timol y vanillina en fermentaciones ruminales in vitro de raciones con alto contenido en forraje y alto contenido en concentrado, modificaron el perfil de fermentación y el metabolismo nitrogenado. Sin embargo los efectos fueron distintos según el compuesto, la dosis y las condiciones de fermentación, lo que confirma que los compuestos de aceites esenciales pueden tener diferentes mecanismos de acción.
7. La mayoría de los compuestos fenólicos demostraron poseer una gran capacidad antimicrobiana, descrita con anterioridad, disminuyendo la concentración total de AGV. Además, algunos compuestos actuaron como moduladores del pH sobre una ración con alto contenido en concentrado.
8. El eugenol y el timol modificaron la fermentación de una ración con alto contenido en forraje reduciendo la concentración de N amoniacal y modificando el perfil de fermentación.

CAPÍTULO 7

ANEXO

Effect of adaptation time of a specific blend of essential oils compounds on dry matter, crude protein and fiber degradability of soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay in sheep

Abstract

Eight sheep (average body weight of 57 kg) were used to study the effects of adaptation time of a specific blend of essential oils compounds (BEO, CRINA® RUMINANTS) on in vitro ruminal degradation of dry matter (DM) and crude protein (CP) of soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay, and fiber degradation of alfalfa hay and ryegrass hay using an in vitro incubation system. Animals received 1.3 kg of a 500 g/kg forage and 500 g/kg concentrate diet (157 g/kg CP; 384 g/kg NDF). Four sheep were assigned at random to the CTR treatment (no BEO) and four sheep were adapted to BEO (110 mg/d of BEO) for four weeks (ADBEO). After four weeks, ruminal fluid collected from each of CTR and ADBEO sheep was used to inoculate 4 CTR jars and 4 ADBEO jars in an in vitro incubation system. Treatments were: Control fluid (CTR without BEO) and ADBEO fluid plus a single dose of 11 mg/l of BEO (ADBEO+BEO). Treatment ADBEO+BEO had no effect DM, CP and fiber degradation of feeds compared with CTR.

1. Introduction

Previous studies (McEwan et al., 2002; McIntosh et al., 2003; Molero et al., 2004; Newbold et al., 2004) reported that a specific blend of essential oil compounds (BEO) can be used to modulate rumen microbial activities, reducing protein degradation and reducing amino acid deamination by inhibiting rumen microorganisms.

The objective of the present study was to determine effects of adaptation time of BEO on ruminal degradation of dry matter (DM) and crude protein (CP) of soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay, and degradation of neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) of alfalfa hay and ryegrass hay using an in vitro incubation system.

2. Material and Methods

Eight Ripolles non-pregnant ewes (BW 57 ± 2.3 kg) received 1.3 kg of a diet (157 g/kg CP, 384 g/kg NDF, 245 g/kg ADF) consisting of (DM basis) alfalfa hay (349 g/kg), ryegrass hay (148 g/kg), corn grain (114 g/kg), barley grain (114 g/kg), cottonseed (79 g/kg), molasses (32 g/kg), soybean meal (16 g/kg), corn glutenfeed (116 g/kg), calcium soaps of fatty acids (12 g/kg) and the same mineral and vitamin mixture as in Experiment 1 (20 g/kg).

Four sheep were assigned at random to the control treatment (CTR, without BEO) and four sheep were assigned to a long term (4 weeks) adaptation to BEO treatment (ADBEO, 110 mg/d of BEO) that was dosed once daily by means of a gelatin capsule. Considering a rumen volumen of 10 l (rumen volum = $BW^{0.57}$, Owens and Goetsch, 1988) and a dilution rate of 10%/h, the estimated rumen fluid flow through the rumen is around 24 l/d. Therefore, the estimated rumen concentration of BEO was approximately 5 mg/l.

Ruminal fluid taken from each of control sheep (control rumen fluid, CTR) and sheep adapted to BEO for four weeks (ADBEO) was used to inoculate 4 CTR jars and 4 ADBEO jars in an in vitro incubation system (Daisy^{II} incubator, ANKOM Technology, Fairport, New York, USA). Treatments were: Control fluid (CTR without BEO) and ADBEO fluid plus a single dose of 11 mg/l of BEO (ADBEO+BEO). One liter of rumen fluid was filtered through two layers of cheesecloth and mixed with 1 l of phosphate-bicarbonate buffer (McDougall, 1948), and pH standardized at 7.0. Two liters of the diluted fluid in each of the jars was continuously gassed with CO₂ before and during placement of test samples. Incubations were conducted at 39°C and bottles were in continuous rotation. Degradability of DM and CP was tested on sample of soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay at four incubation times (0, 6, 12 and 24 hours). A 50 x 50 mm nylon bags (ref. R510, ANKOM Technology, Fairport, New York, USA) with a pore size of 50 ± 15 µm were used. Degradability of NDF and ADF was tested on sample of alfalfa hay and ryegrass hay at four incubation times (0, 6, 12 and 24 hours). In this case, 55 x 55 mm bags for fiber analysis (ref. F57 filter bags, ANKOM Technology, Fairport, New York, USA) with a pore size of 30 µm were used. Feeds were ground through a 1 mm screen, and 0.5 g of each sample were weighed into

bags in duplicate. A total of 36 bags were placed within each jar containing rumen fluid with buffer in a DAISY^{II} incubator. After removal from the jar, bags were machine washed for three cycles of 5 min each in a commercial washing machine (JATA, Spain). After washing, bags were dried in a 103°C forced air oven for 24 h.

3. Results and Discussion

The degradation of DM and CP of soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay increased ($P < 0.0001$) with incubation time and was different ($P < 0.0001$) among feeds (Table 2.3), being degradation of DM highest in soybean meal and corn meal and lowest in alfalfa hay and ryegrass hay, and degradation of CP highest in alfalfa hay and corn meal, and lowest in soybean meal and ryegrass hay. The degradation of NDF and ADF of alfalfa hay and ryegrass hay increased ($P < 0.0001$) with incubation time and was different ($P < 0.0001$) between the two forage (Table 2.4), being degradation of NDF highest in alfalfa hay compared with ryegrass hay and degradation of ADF highest in ryegrass hay compared with alfalfa hay.

The addition of BEO had no effect on the degradation of DM, CP of soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay, and the degradation of NDF or ADF of alfalfa hay and ryegrass hay (Table 2.3). In contrast, Newbold et al. (2004) and Molero et al. (2004) reported small effects of BEO on degradation of DM and CP of some supplements tested. Newbold et al. (2004) reported that BEO only inhibited ruminal degradation of soybean meal N from Dacron bags incubated in situ but not heat-treated rapeseed meal or hay. Molero et al. (2004) reported small reductions of CP degradation with an adaptation period of only 10 days. When the adaptation period was 28 days, the addition of BEO reduced protein degradation of sunflower meal and tended to reduce protein degradation of soybean meal.

4. Conclusions

The addition of BEO during four weeks had no effect on the degradation of DM, CP, NDF and ADF of soybean meal, corn meal, alfalfa hay and ryegrass hay using an in vitro incubation system.

References

- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99-109.
- McEwan, N. R., Graham, R. C., Wallace, R. J., Losa, R., Williams, P., Newbold, C. J., 2002. Effects of essential oils on protein digestion in the rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 (Suppl. 1), S65-S66 (Abstract).
- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A., Newbold, C. J., 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5011-5014.
- Molero, R., Ibars, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R., 2004. Effect of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate rations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 91-104.
- Newbold, C. J., McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 114, 105-112.
- Owens, F. N., A. L. Goetsch. 1988. Ruminant Fermentation. In: *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*, 145-171. D. C. Church (ed.) Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.

Table 1. Effect of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on degradation of DM and CP of soybean meal (SBM), corn meal (CM), alfalfa hay (AH) and ryegrass hay (RH)

Feeds	SBM		CM		AH		RH		SEM	P< ²			
	Treatments ¹	CTR	ADBEO+BEO	CTR	ADBEO+BEO	CTR	ADBEO+BEO	CTR		ADBEO+BEO	Feeds	Treatments	F*T
Degradation of DM													
h 0		263	263	202	202	284	284	243	243	28.8	****	NS	NS
h 6		539	543	793	697	548	552	333	338				
h 12		777	795	904	888	648	658	456	464				
h 24		956	983	964	967	704	704	712	631				
Degradation of CP													
h 0		77.5	77.5	133	133	392	392	307	307	33.0	****	NS	NS
h 6		433	437	687	560	727	731	468	480				
h 12		719	761	839	806	845	866	608	620				
h 24		930	968	949	965	886	892	752	765				

¹CTR = Control rumen fluid; ADBEO+BEO = Adapted rumen fluid plus a single dose of BEO.

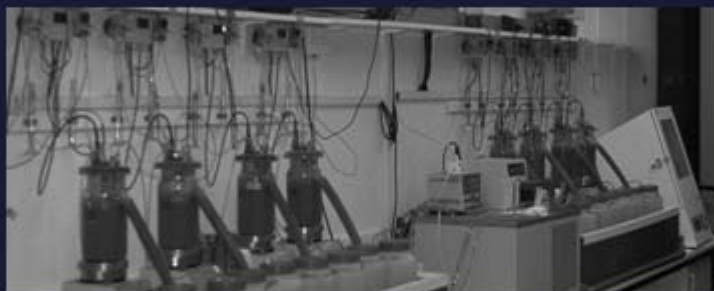
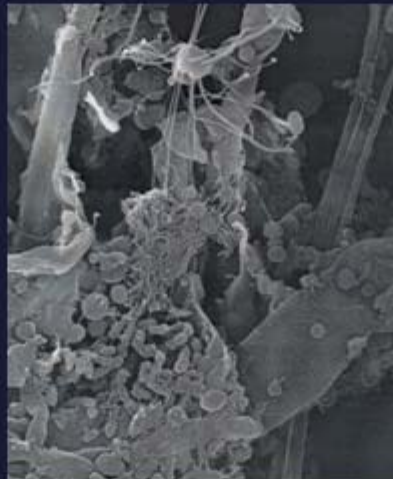
²NS = P > 0.10; *** P < 0.01.

Table 2. Effect of a specific blend of essential oil compounds (BEO) on degradation of NDF and ADF alfalfa hay (AH) and ryegrass hay (RH)

Feeds	AH		RH		SEM	P< ²			
	Treatments ¹	CTR	ADBEO+BEO	CTR		ADBEO+BEO	Feeds	Treatments	F*T
Degradation of NDF									
h 0		579	579	450	450	52.0	***	NS	NS
h 6		620	590	558	465				
h 12		668	665	597	590				
h 24		783	774	741	744				
Degradation of ADF									
h 0		697	697	723	723	9.2	****	NS	NS
h 6		675	693	716	714				
h 12		705	698	727	720				
h 24		798	796	814	823				

¹CTR = Control rumen fluid; ADBEO+BEO = Adapted rumen fluid plus a single dose of BEO.

²NS = P > 0.10; *** P < 0.01.



Universitat Autònoma de Barcelona