



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE AGRICOLE INGINEREȘTI
FACULTATEA DE ZOOTEHNIE ȘI BIOTEHNOLOGII



MIHAELA GIUBURUNCĂ

**EFECTELE *IN VITRO* A UNOR METABOLIȚI SECUNDARI
VEGETALI ȘI A ANTICORPILOR IgY AVIARI ASUPRA
EMISIILOR DE GAZE LA RUMEGĂTOARE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

Prof. univ. dr. MIREȘAN VIOARA

CLUJ-NAPOCA
2015

CUPRINS

INTRODUCERE.....	III
------------------	-----

PARTEA I STUDIUL BIBLIOGRAFIC

CAPITOLUL I	IV
EMISIILE DE GAZ METAN RUMINAL - O PROBLEMĂ LA NIVEL MONDIAL	IV
CAPITOLUL II.....	V
CARACTERIZAREA ANATOMICĂ ȘI FIZIOLOGICĂ A RUMENULUI ȘI MECANISMUL DE PRODUCERE A GAZULUI METAN RUMINAL.....	V
CAPITOLUL III.....	VI
PROCESUL DE METANOGENEZĂ RUMINALĂ	VI
CAPITOLUL IV	VII
POLIFENOLII ȘI IMUNOGLOBULINELE IGY AVIARE UTILIZATE ÎN REDUCEREA EMISIILOR DE GAZ METAN RUMINAL	VII
CAPITOLUL V.....	VIII
STRATEGII DE REDUCERE A EMISIILOR DE GAZ METAN RUMINAL	VIII

PARTEA A-II-A CERCETĂRI PROPRII

CAPITOLUL VI	IX
ORGANIZAREA DISPOZITIVULUI EXPERIMENTAL ȘI DESFĂȘURAREA EXPERIMENTELOR	IX
CAPITOLUL VII	XI
PROTOCOLUL EXPERIMENTAL DE INCUBARE A CULTURILOR RUMINALE.....	XI
CAPITOLUL VIII.....	XII
TESTAREA METABOLIȚILOR SECUNDARI AI PLANTELOR ASUPRA PARAMETRILOR DE FERMENTAȚIE A CULTURILOR RUMINALE ADĂUGAȚI ÎN DOZĂ UNICĂ <i>IN VITRO</i>	XII
CAPITOLUL IX	XIV
TESTAREA METABOLIȚILOR SECUNDARI AI PLANTELOR ASUPRA PARAMETRILOR DE FERMENTAȚIE A CULTURILOR RUMINALE ADĂUGAȚI PERIODIC <i>IN VITRO</i>	XIV
CAPITOLUL X.....	XV
TESTAREA IMUNOGLOBULINELOR IGY SPECIFICE AVIARE ASUPRA PARAMETRILOR DE FERMENTAȚIE A CULTURILOR RUMINALE <i>IN VITRO</i>	XV

CAPITOLUL XI	XVII
CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A COMUNITĂȚII DE MICROORGANISME METANOGENE RUMINALE	XVII
CAPITOLUL XII	XX
CONCLUZII GENERALE	XX
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	XXII

REZUMAT
al tezei de doctorat

**EFECTELE *IN VITRO* A UNOR METABOLIȚI SECUNDARI VEGETALI ȘI A
ANTICORPILOR IgY AVIARI ASUPRA EMISIILOR DE GAZE LA RUMEGĂTOARE**

elaborată de Giuburuncă Mihaela, sub conducerea științifică a Prof. dr. ing. Vioara Mireșan, de la
Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca

Lucrarea “Efectele *in vitro* a unor metabolite secundari vegetali și a anticorpilor IgY aviari asupra emisiilor de gaze la rumegătoare” cuprinde două părți, structurate în 12 capitole.

INTRODUCERE

Activitatea de creștere a rumegătoarelor s-a intensificat în ultimii ani datorită boom-ului economic, a urbanizării și a modernizării fermelor. Numărul ridicat al rumegătoarelor se datorează în mare parte și faptului că acestea au capacitatea unică de a converti compușii organici în produse, care sunt consumate în fiecare zi de către oameni.

În urma procesului de fermentație care are loc în rumen, se formează gaze care sunt eliminate de către animal în atmosfera terestră. Gazele ruminale sunt corelate cu activitatea microorganismelor din rumen, iar generarea gazului metan reprezintă o pierdere foarte mare din energia necesară animalului.

Deoarece emisiile de metan ruminal au devenit o problemă la nivel mondial, în ultima perioadă de timp s-a încercat dezvoltarea unor strategii de diminuare a cantității de gaze emise de rumegătoare. De cele mai multe ori, aceste strategii sunt limitate la furajarea animalului, la fiziologia animalului dar și la condițiile de management al fermelor. Cercetările în acest domeniu au pornit de la primele teste *in vitro* dar s-au realizat și testări *in vivo*, acest lucru demonstrând că unele metode pot fi de durată și pot fi aplicate zi de zi la nivel de fermă.

Cercetările noastre contribuie la dezvoltarea acestor strategii și doresc să facă cunoscută această problemă și la nivelul țării noastre, unde sectorul de creștere a animalelor este în plină dezvoltare.

Cele mai studiate strategii de diminuare a metanului ruminal sunt cele care implică utilizarea de aditivi furajeri și schimbarea alimentației animalului dar și cele care folosesc biotehnologiile, cum ar fi producerea unui vaccin împotriva metanogenilor sau eliminarea protozoarelor ruminale.

Utilizarea extractelor din plante pentru a inhiba activitatea metanogenilor a devenit o strategie foarte studiată și care are rezultate promițătoare. Extractele din plante au efecte antimicrobiene și antioxidante și sunt folosite de către oameni în medicina tradițională. Folosirea acestora la nivel de fermă poate implica costuri mai scăzute comparativ cu utilizarea altor strategii.

O altă abordare în ceea ce privește dezvoltarea unei strategii de scădere a nivelului de emisii de metan ruminal este și utilizarea anticorpilor IgY aviari. Astfel, la rumegetoare, anticorpul IgY a fost testat pentru a diminua riscul de acidoză ruminală și pentru a reduce efectele procesului de metanogeneză ruminală.

Există rezultate favorabile în urma cercetărilor atât *in vitro* cât și *in vivo*, însă transformarea ecosistemului ruminal pentru a reduce emisiile de metan este o provocare științifică care trebuie să ia în considerare atât efectele asupra sănătății și bunăstării animalului, cât și managementul fermelor, în ceea ce privește ecuația de câștig-pierdere.

PARTEA I STUDIUL BIBLIOGRAFIC

CAPITOLUL I EMISIILE DE GAZ METAN RUMINAL - O PROBLEMĂ LA NIVEL MONDIAL

În acest capitol este evidențiat impactul produs de activitatea de creștere a rumegetoarelor asupra schimbărilor climatice. Conform FAO, agricultura este responsabilă de aproximativ 14% din emisiile de gaze cu efect de seră. O parte semnificativă a acestor emisii o reprezintă emisiile de gaz metan, a cărui contribuție este de 23 de ori mai puternică decât a dioxidului de carbon și reprezintă 16% din totalul de emisii de gaze cu efect de seră.

Rumegetoarele au o capacitate unică de a converti celuloza din plante în carne, lapte, lână și pielele, și nu sunt în competiție directă cu hrana oamenilor. Gazul metan este format într-unul dintre cele patru compartimente stomacale (mai exact în rumen) a rumegetoarelor sub acțiunea unor microorganisme numite *metanogeni*, care formează un grup din domeniului *Archaea*. Prin formarea

gazului metan în rumen, rumeătoarele pierd până la 15% din energie, procesul digestiv nefiind 100% eficient.

În urma unui studiu realizat pentru estimarea globală a emisiilor de metan produse de bovinele crescute în România pe parcursul perioadei 1938-1989, s-a concluzionat că pe parcursul a a 24 de ore a rezultat o producție medie de 184 de litri de metan pentru vaci și 162 de litri în 24 de ore pentru bovinele în creștere (Zorzoliu și Zorzoliu, 1992).

Conform EPA, emisiile anuale de gaz metan provenite din fermentația enterică au crescut cu până la 4,3% între anii 1990 și 2007, chiar dacă s-au observat fluctuații în ceea ce privește valorile emisiilor între acești ani (între anii 1994 și 2004 s-au observat valori în scădere). Acest efect poate fi atribuit dezvoltării sectorului agricol, în special cel ce implică creșterea de bovine de carne (www.epa.gov). În Europa, dar și în țara noastră, pe parcursul timpului s-a dorit dezvoltarea acestui sector de creștere a animalelor în vederea asigurării necesarului de producții (în special carne și lapte) dar și în vederea îmbunătățirii calitative a acestora.

Factorii majori care influențează emisiile de gaz metan ruminal sunt în special calitatea hranei pe care animalul o consumă, cum ar fi tipul de carbohidrați și modificarea compoziției microflorei ruminale (Lascano și Cárdenas, 2010). Hrana consumată de animal este fermentată în rumen cu ajutorul bacteriilor, protozoarelor, metanogenilor, fungilor, iar polizaharidele din furaj sunt convertite la acizi grași volatili (AGV) și proteină microbiană, însoțită de eliberarea de produși gazoși (Lascano și Cárdenas, 2010).

Sejian și colaboratorii, (2011) au studiat și au enumerat unii factorii care influențează producția de gaz metan ruminal, cum sunt: specia, reproducția, compoziția, proporția și sursa hranei, cantitatea de nutrienți digerabili, strategii de hrănire, stressul de creștere, practici de management, raportul dintre acetat și propionat, simbiozii ruminali și pH-ul lichidului ruminal (Lascano și Cárdenas, 2010).

CAPITOLUL II

CARACTERIZAREA ANATOMICĂ ȘI FIZIOLOGICĂ A RUMENULUI ȘI MECANISMUL DE PRODUCERE A GAZULUI METAN RUMINAL

Acest capitol evidențiază particularitățile anatomice dar și cele fiziologice ale rumeătoarelor, pentru a putea înțelege mai bine procesele care au loc la nivelul rumenului. Rumeătoarele spre deosebire de animalele monogastrice prezintă trei compartimente pregastrice (rumen, rețea și foios), cel

mai important și dezvoltat fiind rumenul, care are o microfloră și microfaună ce permite ca alimentația acestora să fie cu precădere fibroasă, chiar dacă se folosește un furaj unic.

Rumenul, este un organ voluminos care ocupă aproape toată jumătatea stângă a cavității abdominale a rumegetoarelor (Mireșan și colab., 2003) și de multe ori este descris ca și o “cuvă de fermentație” (Moran, 2005). Microorganismele ruminale utilizează componenții din furaje pentru necesitățile proprii, dar odată cu digerarea lor în stomac și intestin, pun la dispoziția animalului gazdă proteină microbiană. Acestea degradează furajul în produși de fermentație, cum ar fi hidrogen, acetat, propionat, butirat. O parte din acești produși sunt absorbiți de către epiteliul rumenului, astfel fiind folosiți ca și energie de către animal (Janssen, 2010).

În rumen se produc cantități majore de acizi grași volatili (AGV), în special de acid acetic, propionic și butiric (Bergman și colab., 1965) și sunt absorbiți în mare măsură la nivelul mucoasei ruminale (Mireșan și Mireșan, 1997).

Rumenul conține o varietate mare de specii bacteriene care au fost clasificate și numite de-a lungul timpului de mai mulți savanți, printre care și Marvin Bryant care în anul 1959 publică studiul său în ceea ce privește speciile de microorganisme care populează rumenul. Microorganismele care populează rumenul sunt microorganisme facultativ anaerobe (*Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *S. Liquefaciens*), microorganisme anaerobe (*Lactobacillus lactis*, *C. sporegenes*), microorganisme metanogene (*Methanobrevibacter ruminantium*, *M. smithii*) și protozoare.

CAPITOLUL III PROCESUL DE METANOGENEZĂ RUMINALĂ

În capitolul III este prezentat procesul de metanogeneză ruminală, acesta fiind important în realizarea unei strategii de mitigarea a emisiilor de gaz metan. General vorbind, metanogeneza este procesul biologic de producere a gazului metan de către metanogeni. Aceste microorganisme produc cea mai mare parte a gazului metan, care este estimat la 5×10^{14} g de metan pe an (www.ncbi.nlm.nih.gov). Alte microorganisme care produc gaz metan sunt unele Eubacterii, însă doar metanogenii pot să cupleze generarea gazului metan la energie (Sirohi și colab., 2010).

Procesul de metanogeneză este realizat cu ajutorul unor enzime unice pe care speciile de metanogeni le poartă: *Coenzima 420* (N-(N-L-lactil-i-glutamyl) L-acid aglutamic fosfodiester 7,8-didemetil) 8-hidroxi-5-dezariboflavin 5 fosfat, factorul F_{420} care este un transportor cu potențial scăzut de electroni și este similar cu nicotinamida, *Coenzima M* (acid 2-mercaptoetansulfonic) este cel mai

mic cofactor cunoscut iar până în anul 1999 era considerat unic la metanogeni, *Coenzima B* este un cofactor incolor, iar în ultimii ani a primit numele de *component B* și a fost identificat ca fiind unul dintre cele trei fracții necesare pentru reconstituirea metil-coenzimei-reductaza (Sirohi și colab., 2010), *Metanofuran* care este factorul de reducere a dioxidului de carbon și este unicul cofactor care conține radicalul *furan*, și *Metanopterin* care este asemănător acidului folic ca și structură iar în procesul de metanogeneză reprezintă un intermediar C1 de transport în reducerea grupului formil la grupul metil (Sirohi și colab., 2010).

CAPITOLUL IV

POLIFENOLII ȘI IMUNOGLOBULINELE IgY AVIARE UTILIZATE ÎN REDUCEREA EMISIILOR DE GAZ METAN RUMINAL

Acest capitol dorește să prezinte unele particularități ale unor extracte din plante care sunt folosite în strategiile de diminuarea a emisiilor de CH₄ ruminal, dar și caracteristicile imunoglobulinelor IgY aviare, care sunt din ce în ce mai studiate în diminuarea de emisii de gaze ruminale. Acizii fenolici sunt compuși polifenolici non-flavonoizi care pot fi divizați în două tipuri principale: acid benzoic și acid cinamic. Acizii hidroxibenzoici sunt componenții unor structuri complexe cum ar fi taninurile hidrolizabile (galo-taninuri din fructele mango și elagi-taninuri din fructele roșii) (Hasna El Gharras, 2009). Jayanegara și colaboratorii (2010) au realizat mai multe studii prin care au testat efectele câtorva surse de polifenoli, printre care și fenoli simpli ca: acid benzoic, cinamic, cafeic, p-cumaric, fenil-acetic și feluric în două concentrații diferite (2 și 5 mM), împotriva metanogenezei ruminale. Ei au descoperit că nici un compus folosit în concentrația cea mai mică (2mM) nu a avut vreo-un efect asupra producerii de gaz metan însă concentrația mai mare (5mM) a avut efecte semnificative.

Taninurile acționează asupra metanogenilor ruminali în două moduri: au un efect direct asupra microorganismelor dar au și un efect indirect asupra producției de hidrogen. Mai multe teste cu taninuri extrase din *Lotus corniculatus*, *Lotus pendunculatus* și *Acacia mearnsii*, folosite împotriva metanogenilor ruminali, au redus cantitatea de metan produs, cu aproximativ 30% fără să altereze digestibilitatea la rumegătoare mici (oi, alpaca, capre) (Pinares-Patino și colab., 2003c; Carulla și colab., 2005; Puchala și colab., 2005).

La animalele rumegătoare, anticorpii IgY aviari au fost testați pentru a diminua riscul de acidoză ruminală și pentru a reduce efectele procesului de metanogeneză ruminală. Rezultatele testelor

unde anticorpii au fost folosiți împotriva metanogenilor ruminali (*Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter ruminantium* și *Methanosphaera stadtmanae*) au arătat că aceștia au scăzut cantitatea de gaz metan *in vitro* ($p \leq 0,05$) dar efectul a fost trecător, urmând ca după 24 de ore rezultatele să fie asemănătoare cu cele ale probelor martor (Marcq și colab., 2010).

CAPITOLUL V

STRATEGII DE REDUCERE A EMISIILOR DE GAZ METAN RUMINAL

Acest capitol evidențiază câteva strategii de reducere a emisiilor de gaz metan ruminal și deasemenea dorește să prezinte și exemple de studii realizat atât *in vitro*, cât și *in vivo*. Astfel, scopul ideal al acestor strategii ar fi reducerea gazului metan produs (litri/zi) per animal. Dar totuși, luând în considerare sistemul actual al creșterii animalelor, scopul imediat ar trebui să fie reducerea gazului metan per unitate de produs (lapte sau carne).

Câteva strategii biotehnologice sunt exploatate, printre care și realizarea unui vaccin împotriva a trei specii de microorganisme metanogene din rumen care a redus cantitatea de metan cu aproape 8% (Wright și colab., 2004).

Folosirea probioticelor ca și strategie de mitigare a gazului metan ruminal este o abordare interesantă. Acetogeneza reductivă este un mecanism natural de utilizare a hidrogenului care coexistă cu metanogeneza în tractul gastrointestinal al mai multor animale. În rumen, acetogenii sunt mai puțin numeroși și mai puțin eficienți decât metanogenii în competiția de reducere a echivalenților. Folosirea acetogenilor ca și probiotice a fost testată dar rezultatele nu au fost satisfăcătoare sau nu au fost concludente (Martin și colab., 2009).

În ecosistemul ruminal, metanogenii trăiesc în asociere cu protozoarele, astfel că acest sistem favorizează transferul hidrogenului (Martin și colab., 2009). S-a estimat că metanogenii care sunt atașați de protozoare, contribuie între 9 și 37% la metanogeneza ruminală (Martin și colab., 2009). Eliminarea protozoarelor ruminale pare foarte interesantă dar această opțiune trebuie evaluată în termeni de performanță în cazul creșterii animalelor.

Folosirea aditivilor furajeri a fost intens cercetată și aplicată în unele țări ca Noua Zeelandă sau Australia mai mulți ani, având efecte pozitive asupra productivității și asupra mediului.

Alimentația animalelor a fost încă de la începuturi un subiect foarte important în toate studiile realizate pe această temă. S-a ajuns la concluzia că toate tipurile de furaje au un impact asupra

procesului de metanogeneză ruminală, iar folosirea anumitor tipuri de furaje poate avea efecte semnificative asupra acestuia.

PARTEA A-II-A CERCETĂRI PROPRII

Partea a doua a prezentei teze de doctorat evidențiază cercetările proprii realizate pe parcursul anilor de doctorantură. Sunt prezentate pe larg, în 7 capitole, toate experimentele realizate, prin metode moderne de cercetare. Pe lângă acestea, sunt prezentate și rezultatele, concluziile și discuțiile obținute în urma acestor experimente.

CAPITOLUL VI ORGANIZAREA DISPOZITIVULUI EXPERIMENTAL ȘI DESFĂȘURAREA EXPERIMENTELOR

Acest capitol evidențiază scopul și obiectivele tezei de doctorat, elementele de originalitate, organizarea dispozitivului experimental, și deasemenea desfășurarea experimentelor.

6.1 SCOPUL ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE CERCETĂRILOR

Scopul acestei lucrări a fost de a testa și evalua efectul pe care utilizarea unor metaboliți secundari ai plantelor precum și a unor anticorpi aviari IgY specifici, îl au asupra populațiilor de microorganisme metanogene din rumen, respectiv supra procesului de fermentație ruminală.

Obiectivele prezentei teze de doctorat sunt:

- 1. Testarea a patru metaboliți secundari ai plantelor (acid cafeic, acid p-cumaric, acid trans-cinamic și catechin hidrat) la concentrația 6 mM și 12 mM asupra unor parametri ai fermentației ruminale *in vitro*: volumul total al gazului, compoziția gazului, profilul acizilor grași și pH-ul;**

- 2. Utilizarea imunoglobulinelor IgY aviare specifice în vederea reducerii populațiilor de microorganisme metanogene și determinarea efectului asupra procesului de fermentație *in vitro*;**
- 3. Evidențierea impactului pe care utilizarea metaboliților secundari ai plantelor și a anticorpilor specifici îl au asupra comunității de microorganisme *Archaea* prezente în lichidul ruminal.**

6.2 ELEMENTE DE ORIGINALITATE ALE TEZEI

Elementele de originalitate ale prezentei teze le considerăm a fi următoarele:

- testarea unor metaboliți secundari ai plantelor asupra procesului de metanogeneză ruminală *in vitro*;
- folosirea metaboliților secundari ai plantelor și a anticorpilor specifici în doză unică și repetată pentru a determina efectul în timp al administrării acestora;
- identificarea comunității de microorganisme *Archaea* prin tehnici noi de biologie moleculară.

6.3 ORGANIZAREA EXPERIMENTELOR

Toate experimentele, cu excepția celor de producere și izolare de imunoglobuline IgY specifice, au fost realizate în cadrul laboratoarelor departamentelor de Microbiologia Mediului și Bioenergie ale centrului de cercetare pentru mediu “*Helmholtz Zentrum für Umweltforschung UFZ*” în cooperare cu centrul de cercetare pentru biomasă “*Deutsches Biomasseforschungszentrum DBFZ*” din orașul Leipzig, Germania. Acestea au fost desfășurate pe parcursul anilor 2013-2014.

Pentru a atinge obiectivele propuse ale acestei teze de doctorat, s-a realizat un microcosmos ruminal anaerob prin utilizarea mai multor tehnici speciale. Astfel, pregătirea și punerea în aplicare a microcosmosului ruminal propriu-zis s-au realizat într-o cameră anoxică dar și sub hotă cu flux laminar, folosind tehnica de lucru dezvoltată de Hungate.

Materialul biologic folosit în testele noastre a fost lichid ruminal proaspăt, colectat prin metoda fistulei ruminale de la ovine furajate cu lucernă uscată. Ovinele aparțin Clinicii de Medicină Veterinară din cadrul Universității Leipzig din Germania. Lichidul ruminal a fost colectat în ziua începerii fiecărui

test (experiment) înainte de furajarea de dimineată, în sticle termice și transportate în cel mai scurt timp în laborator.

Ca și substrat pentru culturile ruminale s-a utilizat lucerna uscată, tăiată în particule fine cu ajutorul unei mori și a unei site de 10 mm. Lucerna uscată era principalul furaj pentru oile de la care s-a colectat lichidul ruminal proaspăt.

Mediul de cultură pentru metanogeni trebuie să ofere acestora necesarul nutritiv (compuși pe bază de C, H,O,N,P,S etc) și să stabilească condițiile fizico-chimice necesare pentru creștere: pH-ul, absența oxigenului, nivelul redox. Astfel, mediul de cultură folosit a fost *Mediul pentru Metanogeni 141 DSM* (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

Extractele din plante care au fost testate în experimentele proprii sunt metaboliți secundari ai plantelor, mai exact acizii fenolici: acid cafeic, acid trans-cinamic, acid p-cumaric și flavonoidul catechin hidrat, achiziționați de la Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germania. Alături de aceste extracte, am studiat și efectul imunoglobulinelor IgY aviare, acestea fiind izolate în cadrul laboratorului de Imunologie a Facultății de Zootehnie și Biotehnologii, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca.

CAPITOLUL VII

PROTOCOLUL EXPERIMENTAL DE INCUBARE A CULTURILOR RUMINALE

Acest capitol face referire la descrierea protocolului experimental de incubare a culturilor ruminale *in vitro*. Astfel, pe scurt, protocolul de incubare a culturilor ruminale folosit (după Bodas și colab., 2009) este redat mai jos:

- colectarea lichidului ruminal înainte de furajarea de dimineată de la ovine fistulate;
- strecurarea fluidului ruminal prin 2 straturi de fașă sterilă și păstrarea în condiții anoxice;
- măsurarea lichidului ruminal în sticlele de cultură de 100 ml care conțin substratul necesar;
- adăugarea mediului de cultură la sticlele de cultură;
- adăugarea extractelor de plante și/ a imunoglobulinelor IgY la sticlele de cultură;
- incubarea sticlelelor de cultură la 39°C;
- la punctul 0 al experimentului, și după 24, 48 respectiv 72 ore: determinarea parametrilor de interes- volumul gazului produs (nu la punctul 0), compoziția gazului produs cu ajutorul Gaz-

cromatografiei, concentrația acizilor grași volatili cu ajutorul Cromatografiei de lichide de înaltă performanță și pH-ul.

CAPITOLUL VIII

TESTAREA METABOLIȚILOR SECUNDARI AI PLANTELOR ASUPRA PARAMETRILOR DE FERMENTAȚIE A CULTURILOR RUMINALE ADĂUGAȚI ÎN DOZĂ UNICĂ *IN VITRO*

8.1 SCOPUL ȘI OBIECTIVELE EXPERIMENTULUI

Scopul acestor experimente a fost de a testa patru extracte din plante reprezentate prin metaboliți secundari ai plantelor (acid trans-cinamic, acid cafeic, acid p-cumaric și catechin hidrat) asupra producției de gaze și asupra parametrilor de fermentație a culturilor ruminale *in vitro*. Aceștia au fost testați inițial într-o concentrație de 6mM, iar în urma acestui test inițial doi dintre ei au fost eliminați (acidul trans-cinamic și catechin hidrat), realizându-se un alt experiment în care concentrația compușilor a fost dublată. Acidul trans-cinamic și extrasul de catechin hidrat au fost eliminați deoarece au prezentat creșteri semnificative de gaz metan.

Rezultatele prelucrate inițial în Excel ale experimentelor au fost analizate cu ajutorul programului statistic GraphPad Prism 6 (opțiunea one way ANOVA- one-way analysis of variance), iar diferențele dintre medii au fost analizate cu ajutorul Testului Duncan (opțiune din cadrul programului PoliFact).

8.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

8.2.1 Efectele metaboliților secundari ai plantelor adăugați în concentrația de 6 mM

S-a observat, în urma experimentului în care s-au adăugat la culturile ruminale, concentrația de 6 mM de acid cafeic și acid p-cumaric, că acestea din urmă au avut tendința să descrească cantitatea de gaz metan (Giuburuncă și colab., 2014) (după 24 de ore, proba martor a prezentat o valoare medie de 5,51 ml/100 ml CH₄, valoarea fiind mai crescută comparativ cu celelalte probe, și anume: 4,08 ml/100 ml pentru proba cu acid cafeic, 4,07 ml/100 ml pentru proba cu acid p-cumaric, 5,47 pentru proba cu catechin hidrat și 5,51 pentru proba cu acid trans-cinamic) însă diferențele nu au fost semnificative

statistic. Nici după 48 și 72 de ore nu s-au observat diferențe semnificative. Profilul acizilor grași volatili studiați în cadrul acestui experiment nu a suferit modificări majore (Giuburuncă și colab., 2015), observându-se valori medii mai scăzute pentru probele la care s-au adăugat acizii fenolici, însă nu semnificativ din punct de vedere statistic. Valoarea pH-ului a fost pentru toate probele apropiată de valoarea probei martor, încadrându-se totodată în intervalul normal (6,4-6,7). Pentru celelalte gaze emise de culturile ruminale, și anume hidrogenul și dioxidul de carbon, nu s-au înregistrat efecte semnificative. Rezultatele acestui experiment au dus la decizia de elimina doi dintre metaboliți secundari (acidul trans-cinamic și catechin hidratul) și continuarea experimentelor doar cu ceilalți doi, și anume acidul cafeic și acidul p-cumaric, aceștia având cele mai bune rezultate în ceea ce privește producția de gaz metan.

8.2.2 Efectele metaboliților secundari ai plantelor adăugați în concentrația de 12 mM

După analizarea rezultatelor provenite în urma folosirii metaboliților secundari ai plantelor în concentrația de 6 mM s-a hotărât efectuarea unui experiment în care concentrația acestora să fie mai mare, dublată, dar și renunțarea la două dintre extracte, acestea fiind acidul trans-cinamic și catechin hidrat.

Metaboliții secundari ai plantelor (acid cafeic și acid p-cumaric) adăugați în doză unică la culturile ruminale în concentrația 12 mM au prezentat efecte semnificativ statistic de diminuarea a emisiilor de CH₄ după 24 de ore de incubare (proba martor a prezentat o valoare medie de 4,91 ml/100ml CH₄, proba cu acid cafeic a prezentat o valoare medie de 3,40 ml/100 ml iar proba cu acid p-cumaric a avut o valoare medie de 3,48 ml/100 ml CH₄) iar după 48 de ore de incubare, efectul se scădere s-a observat doar pentru acidul cafeic (valoarea pentru proba martor a fost de 8,07 ml/100 ml CH₄, în timp ce proba cu acid cafeic a prezentat o valoare medie de 6,48 ml/100 ml CH₄) acesta fiind semnificativ statistic. Analizele după 72 de ore de incubare au confirmat faptul că efectul acestor două extracte nu este semnificativ asupra emisiilor de metan ruminal. Cantitatea de hidrogen și dioxid de carbon nu a fost afectată de aceste două extracte, diferențe fiind ne semnificative. În cazul acizilor grași volatili, s-au observat diferențe semnificative asupra concentrației de izo-butirat, acidul p-cumaric crescând valoarea acestuia (valoarea medie pentru proba martor a fost de 2,41 mg/l în timp ce concentrația pentru proba cu acid p-cumaric a fost de 3,96 mg-l) după 24 de ore de incubare. După 48 de ore de incubare, s-au observat efecte semnificative și anume, adăugarea de acid p-cumaric a scăzut concentrația de acetat (iar acidul cafeic a scăzut concentrația de izo-butirat. S-au înregistrat efecte

semnificative și după 72 de ore de incubare, acidul p-cumaric diminuând concentrația de acetat și crescând în același timp concentrația de izo-butirat. Ceilalți parametri ruminali nu au fost afectați de adăugarea acestor metaboliți secundari ai plantelor.

CAPITOLUL IX

TESTAREA METABOLIȚILOR SECUNDARI AI PLANTELOR ASUPRA PARAMETRILOR DE FERMENTAȚIE A CULTURILOR RUMINALE ADĂUGAȚI PERIODIC *IN VITRO*

9.1 SCOPUL ȘI OBIECTIVELE EXPERIMENTULUI

Scopul acestui experiment a fost să testăm efectele pe care extractele de acid cafeic și acid p-cumaric le-au avut asupra parametrilor fermentației ruminale când acestea au fost adăugate în soluții aliquote în concentrația de 12 mM la culturile ruminale în 3 timp difertiți: la timpul 0, sau de start a experimentului, după 24 de ore de incubare și după 48 de ore de incubare.

Obiectivele experimentului a fost de a determina parametrii ruminali după 24, 48, respectiv 72 de ore de incubare a culturilor ruminale.

9.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

9.2.1 Efectele metaboliților secundari ai plantelor folosiți în concentrația de 12 mM

În urma experimentului în care acidul cafeic și acidul p-cumaric 12 mM au fost adăugați periodic la culturile ruminale (la trei timp diferiți) s-a observat că după 24 de ore de incubare, emisiile de gaz metan au fost mai scăzute pentru probele în care aceste două extracte au fost adăugate, efectul fiind semnificativ statistic. Proba martor a prezentat o valoare medie de 4,87 ml/100 ml CH₄, în timp ce proba cu acid cafeic a avut o valoare de 3,04 ml/100 ml iar proba cu acid p-cumaric o valoare de 3,49 ml/100 ml. După 24 de ore, la sticlele de cultură s-a mai adăugat o doză de acizi fenolici 12 mM, măsurătorile care au urmat la 48 de ore arătând același efect de scădere a cantității de CH₄. Următoarea doză a fost adăugată la 48 ore, iar după 72 de ore, rezultatele au arătat că doar acidul cafeic și-a mai păstrat efectul inhibant.

Acest experiment arată că adăugarea periodică a acizilor fenolici la culturile ruminale are un efect mai puternic asupra producției de gaz metan ruminal, observându-se diminuări ale acestuia. Celelalte gaze analizate nu au fost afectate semnificativ de prezența acidului cafeic și a acicului p-

cumaric, excepție făcând producția de dioxid de carbon care a fost semnificativ mai mare comparativ cu martorul, după 48 de ore de incubare. Acidul cafeic a avut un efect semnificativ asupra concentrației de izo-butirat după 24 de ore de incubare, celelalte concentrații nefiind afectate semnificativ de prezența acestuia. În cazul concentrației de acetat, după 24 de ore (după a doua doză de acizi fenolici), s-a observat că adăugarea de acid p-cumaric a avut efecte semnificative de scădere. Acidul cafeic a avut efecte semnificative asupra concentrației de izo-butirat, aceasta prezentând valori mai scăzute comparativ cu proba martor. După 72 de ore de incubare (după a treia doză) s-a observat că, doar acidul p-cumaric are efecte semnificative asupra concentrațiilor de acetat și izo-butirat, acestea fiind mai scăzute în comparație cu valorile probei de control.

În urma acestor experimente s-a dedus că acești acizi fenolici se pot adapta la condițiile ruminale, fiind absorbiți sau utilizați de către microorganisme, efectul de inhibare a gazului metan pierzându-se repede. Totodată, scăderea gazului metan nu a fost însoțită de o modificare majoră a concentrațiilor acizilor grași volatili și a pH-ului. Este necesar, ca acești metaboliți secundari ai plantelor să fie utilizați și în cadrul testelor *in vivo* pentru a determina cu exactitate efectul acestora asupra parametrilor fermentației ruminale.

CAPITOLUL X

TESTAREA IMUNOGLOBULINELOR IgY SPECIFICE AVIARE ASUPRA PARAMETRILOR DE FERMENTAȚIE A CULTURILOR RUMINALE *IN VITRO*

10.1 SCOPUL ȘI OBIECTIVELE EXPERIMENTULUI

Scopul acestui experiment a fost de a testa anticorpi aviari IgY specifici anti-metanogeni asupra emisiilor de gaze ruminale. Astfel, obiectivul experimentului a fost de a determina parametrii ruminali (volumul gazului total, compoziția gazului, concentrațiile acizilor grași volatili, pH) după 24, 48, respectiv 72 de ore de incubare a culturilor ruminale.

10.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

10.2.1 Efectele anticorpilor IgY adăugați în doză unică la culturile ruminale asupra parametrilor fermentației ruminale *in vitro*

Anticorpicii IgY specifici au avut efecte semnificative de diminuare a gazului metan după 24 de ore de incubare, și de asemenea s-au observat diminuări și ale cantității de hidrogen. Valoarea probei la care au fost adăugați anticorpicii a prezentat o valoare medie de 3,77 ml/100 ml gaz metan, o valoare mai scăzută comparativ cu proba martor care a avut o valoare medie de 4,87 ml/100 ml. Doza unică de anticorpi nu a mai avut efecte semnificative de scădere a CH₄ ruminal după 48 de ore de incubare, o scădere semnificativă observându-se doar în cazul emisiilor de hidrogen, urmând ca după 72 de ore de incubare, aceste efecte să se piardă. Profilul acizilor grași volatili nu a fost afectat de adăugarea anticorpilor la culturile ruminale după 24 de ore de incubare, observându-se diferențe semnificative statistic doar după 48 de ore, la concentrația de izo-butirat, aceasta fiind mai crescută față de concentrația probei martor. Anticorpicii au crescut semnificativ concentrația de n-butirat și izo-valerat după 72 de ore de incubare și au scăzut concentrația de izo-butirat. Nu s-au observat efecte semnificative asupra valorilor pH-ului, acestea fiind în intervalul normal de la nivelul rumenului.

10.2.2 Efectele anticorpilor IgY adăugați periodic la culturile ruminale asupra parametrilor fermentației ruminale *in vitro*

Imunoglobulinele IgY aviare au fost adăugate, ca și acidul cafeic și acidul p-cumaric, periodic la culturile ruminale. Astfel, s-a observat că anticorpicii au avut efecte semnificative de scădere a gazului metan doar după 24 de ore de incubare, efectul pierzându-se după 48, respectiv 72 de ore de incubare. Nu s-au observat efecte semnificative asupra dioxidului de carbon și asupra hidrogenului emis pe durata experimentului. Efecte semnificative statistic s-au observat asupra concentrației de n-butirat și izo-butirat, anticorpicii diminuând concentrația de n-butirat și crescând concentrația de izo-butirat după 24 de ore. După a doua doză de anticorpi, respectiv după 48 de ore, s-au înregistrat efecte semnificative asupra concentrațiilor de propionat, n- și izo-butirat, astfel că anticorpicii au scăzut concentrațiile de propionat și n-butirat și au crescut concentrația de izo-butirat. Efecte semnificative s-au observat și după 72 de ore de incubare (după a treia doză), astfel că anticorpicii adăugați la culturi au crescut concentrațiile de n-butirat și izo-valerat și au scăzut concentrația de izo-butirat. Nu s-au observat efecte semnificative din punct de vedere statistic asupra celorlalți parametri studiați.

În urma studierii din literatura de specialitate, unde nu s-au găsit experimente care au durat 72 de ore, am ajuns la concluzia că rezultatele noastre pot fi comparate doar până la 48 de ore și este posibil ca anticorpul să fi fost denaturat în timpul procesului de fermentație, aceștia pierzându-și din activitate după 48 de ore. După analizele moleculare a probelor, s-a observat că în lichidul ruminal au existat microorganisme din cadrul genului *Methanobrevibacter*, însă nu s-a putut identifica pe baza analizelor efectuate și specia de metanogeni. Anticorpul a fost produs pentru a funcționa specific, împotriva a două microorganisme din genul *Methanobrevibacter* și este posibil ca aceste două specii să nu fi fost prezente în lichidul ruminal studiat.

CAPITOLUL XI

CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A COMUNITĂȚII DE MICROORGANISME METANOGENE RUMINALE

Producția gazului metan în rumen poate fi afectată de substratele existente în rumen necesare procesului de metanogeneză (în special hidrogen și dioxid de carbon), de inhibarea procesului de metanogeneză dar și de toxicitatea produsă împotriva metanogenilor ruminali. Determinarea microorganismelor metanogene ruminale este necesară într-un studiu care dorește analizarea efectelor unor compuși asupra parametrilor ruminali.

11.1 SCOPUL ȘI OBIECTIVELE EXPERIMENTULUI

Scopul acestui experiment a fost de a caracteriza molecular microorganismele metanogene ruminale atât în probele martor dar și în probele în care s-au adăugat doi dintre acizii fenolici evaluați și în celelalte experimente dar și în probele cu anticorpi aviari. Astfel, pentru acest experiment s-au utilizat probe din sticlele de cultură cu acid cafeic și acid p-cumaric în concentrația de 12 mM, și cu anticorpi IgY aviari.

Obiectivele acestui studiu au fost de a izola ADN genomic din lichidul ruminal din sticlele de cultură, de a amplifica gena *mcrA* care este un marker pentru microorganismele metanogene și de a identifica microorganismele anaerobe ruminale printr-o tehnică modernă de analiză moleculară.

11.2 IZOLAREA ADN-ULUI DIN CULTURI MIXTE DE MICROORGANISME RUMINALE

Pentru a identifica și caracteriza molecular microorganismele metanogene ruminale s-a dorit ca și prim pas izolarea acidului dezoxiribonucleic cu ajutorul unui Kit de extracție. Acesta a fost ales pe baza rezultatelor anterioare avute după un prim pre-experiment. Astfel, kit-ul de izolare a fost testat inițial pe probe preluate din lichid ruminal proaspăt pentru a evalua rezultatele. După evaluarea rezultatelor acestui prim experiment, kitul de extracție a fost folosit și pentru probele preluate din sticlele de cultură (proba martor, proba cu acid cafeic 12 mM, proba cu acid p-cumaric 12 mM și proba cu anticorpi IgY). Kit-ul de izolare folosit a fost “NucleoSpin DNA Kit for Soil” de la Macherey Nagel, care este realizat special pentru izolarea de ADN genomic cu greutate moleculară mare, din microorganisme Gram pozitive sau Gram negative. Deasemenea oferă posibilitatea de a utiliza două soluții tampon de liză care pot fi combinate cu un aditiv chimic (Enhancer SX) care garantează o puritate mai bună pentru toate tipurile de probe.

După izolarea ADN-ului genomic, acesta a fost cuantificat cu ajutorul unui spectrofotometru NanoDrop ND1000 după care s-a realizat reacția de polimerizare în lanț pentru a amplifica gena de interes.

11.3 REACȚIA DE POLIMERIZARE ÎN LANȚ- PCR

Cu ajutorul reacției de polimerizare în lanț (PCR) s-a amplifica gena funcțională *mcrA* care este și un marker pentru microorganismele metanogene. Gena *mcrA* codifică enzima metil-coenzima M reductaza, aceasta fiind importantă în procesul de metanogeneză ruminală. Primerii folosiți în amplificarea genei *mcrA* sunt primerii mlas și *mcrA*-rev (Steinberg și Regan, 2008) cu o lungime a ampliconilor de 470-491 de perechi de baze.

11.4 TEHNICA T-RFLP

Terminal restriction fragment length polymorphism este o tehnică de biologie moleculară utilizată pentru determinarea profilului comunității microbiene bazându-se pe poziția unui situs de restricție apropiat de capătul marcat al unei gene. Metoda este bazată pe digestia unui mix PCR în prezența uneia sau a mai multor enzime de restricție. Astfel se detectează mărimea fiecărui fragment de restricție prin folosirea unui secvențiator ADN. Rezultatul este o imagine grafică numită

electroferogramă unde axa X reprezintă mărimea fragmentului iar axa Y reprezintă intensitatea lui fluorescentă.

11.5 REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru a determina comunitatea de microorganisme metanogene din lichidul ruminal s-a utilizat metoda T-RFLP. Probele supuse acestei metode au fost preluate după 24 de ore de incubare a culturilor ruminale peste care s-au adăugat extractul de acid cafeic și acid p-cumaric în concentrația de 12 mM și anticorpi IgY specifici.

11.5.1 Profilele T-RFLP pentru gena *mcrA* rezultate în urma digestiei cu enzima *BstN*

Restricția cu enzima *BstN* a dus la identificarea pentru probele martor a 5 T-RF-uri care au putut fi atribuite, 1 T-RF cu o abundență mai mare de 1 % care nu a putut fi atribuit și alte 8 T-RF-uri cu abundența mai mică de 1 %, care deasemenea nu au putut fi atribuite nici unui gen de metanogeni: T-RF 470 pb (genul *Methanobrevibacter*) care are abundența de 78,15%, T-RF 473 pb (genul *Methanobacterium*) cu o abundență de 12,82%, fragmentul T-RF 463 pb are o abundența de aproximativ 3% iar T-RF-ul 123 pb are o abundență mai mică de 1%. Pentru probele cu acid cafeic s-a observat că abundența cea mai mare o are fragmentul de restricție 470 pb corespondent genului *Methanobrevibacter*, aceasta fiind de 78,5%. Genul *Methanobacterium* care a fost asignat secvenței de 473 pb are o abundență de 11,41 %. Pentru fragmentul 463 pb i s-a atribuit tot genul *Methanobacterium*, însă abundența este mai mică, de aproximativ 3,40%. Fragmentul terminal de restricție care nu a putut fi atribuit nici unui gen, de 462 pb, are în această probă, o abundență de aprox. 5 %. Celelalte fragmente atribuite, 417 pb (DCM-1), 123 pb (*Methanobacterium*) și 94 pb (*Methanoculleus*) au o abundență mai mică de 1 %. Probele la care s-a adăugat acid p-cumaric 12 mM au următoarele secvențe atribuite: 470pb (*Methanobrevibacter*) cu o abundență de 76,25 %, 473pb (*Methanobacterium*) cu o abundență de 16,87 %, 463 pb (*Methanobacterium*) cu o abundență de aprox. 3 % și o abundență mai mică de 1 % pentru T-RF-ul 123pb și 417 pb.

Fragmentul de 470 pb are o abundență de 78,25 % pentru probele cu anticorpii IgY, acesta fiind genul predominant (*Methanobrevibacter*). Fragmentul 473 pb are o abundență de 12 % iar T-RF-ul 463 are o abundență de aproximativ 3 %. Celelalte fragmente au o abundență mai mică de 1 % (417 pb, 123 pb, 94 pb) iar fragmentul 462 care nu poate fi atribuit, are o abundență de peste 5 %.

11.5.2 Profilele T-RFLP pentru gena *mcrA* rezultate în urma digestiei cu enzima *MwoI*

Cu ajutorul rezultatelor T-RFLP obținute după restricția cu enzima *MwoI* au putut fi atribuite genurilor, 4 fragmente terminale de restricție, dintre care doar două fragmente au o abundență mai mare de 1% (210 pb și 228 pb). Alte 12 fragmente, cu o abundență mai mică de 1% nu au putut fi atribuite nici unui gen din librăria de clone utilizată. Cea mai mare abundență o are T-RF-ul 210 pb care a fost atribuit genului *Methanobrevibacter*, astfel că repetițiile pentru proba martor au o abundență de 20,77 %, proba cu acid cafeic 20,50 %, cea cu acid p-cumaric are o abundență de 25% iar cea cu anticorpi IgY are o abundență de aproximativ 24%.

Fragmentul 228 pb care a fost atribuit arheonului DCM1 prezintă și el o abundență mare, de peste 10 % pentru toate probele. Cea mai mare abundență o au probele cu acid p-cumaric, de 14,13% urmată de probele martor cu o abundență de 11,32 %. Probele cu anticorpii IgY prezintă o abundență de 11 % în timp ce probele cu acid cafeic au o abundență de 10,75 %, fiind cea mai scăzută. Cu enzima *MwoI* s-a putut atribui doar un singur fragment genului *Methanobacterium*. Abundența acestui fragment (438 pb) este însă mai mică de 1 % pentru toate probele. Pentru genul *Methanobrevibacter* s-a mai atribui un fragment, de 444 pb, însă și acesta are o abundență mai mică de 1 %. O abundență mai mare o are fragmentul 311 pb care nu a putut fi atribuit nici unui gen. Acesta are o abundență de aproximativ 25,5 % pentru probele martor, cu acid cafeic și anticorpi IgY și aproximativ 17,5 % pentru proba cu acid p-cumaric. Fragmentul 443 pb are o abundență cuprinsă între 6,5 și 9,9 %, dar nici acesta nu a fost atribuit pe baza librării de clone folosite.

CAPITOLUL XII CONCLUZII GENERALE

În urma experimentelor realizate în cadrul acestei teze de doctorat s-a concluzionat că adăugarea în doză unică de acid cafeic și acid p-cumaric în concentrația de 12 mM la culturile ruminale *in vitro*, a avut efecte semnificative statistic de diminuare a emisiilor de gaz metan după 24 ore de incubare. Acidul cafeic a prezentat același efect și după 48 de ore de incubare. Deasemenea, la adăugarea acestor acizi fenolici periodic, s-au observat efecte semnificative de scădere a metanului ruminal, după 24 și 48 de ore de incubare.

S-a observat că profilul acizilor grași volatili nu a suferit modificări majore după adăugarea acizilor fenolici la culturile ruminale. Efectele acizilor fenolici asupra profilului de acizi grași volatili se

datoarează caracterului antimicrobian al acestor extracte. Majoritatea rezultatelor arată că valorile de AGV au fost mai reduse la probele de test comparativ cu valorile probei martor, însă nu semnificativ. Aproximarea valorilor probelor de test de a valorilor probelor martor indică posibilitatea utilizării acelor extracte ca și substrat fermentative. Aici s-au încadrat acidul trans-cinamic și catechin hidratul în concentrația de 6 mM.

Anticorpul IgY aviari au avut efecte semnificative asupra emisiilor de gaz metan doar după 24 de ore de incubare. Nu s-au observat efecte semnificative din punct de vedere statistic asupra celorlalți parametri studiați. În urma studierii din literatura de specialitate, unde nu s-au găsit experimente care au durat 72 de ore, am ajuns la concluzia că rezultatele noastre pot fi comparate doar până la 48 de ore și este posibil ca anticorpul să fi fost denaturat în timpul procesului de fermentație, aceștia pierzându-și din activitate după 48 de ore. După analizele moleculare a probelor, s-a observat că în lichidul ruminal au existat microorganisme din cadrul genului *Methanobrevibacter*, însă nu s-a putut identifica pe baza analizelor efectuate și specia de metanogeni. Anticorpul a fost produs pentru a funcționa specific, împotriva a două microorganisme din genul *Methanobrevibacter* și este posibil ca aceste două specii să nu fi fost prezente în lichidul ruminal studiat.

Rezultatele experimentelor realizate în cadrul acestei teze de doctorat au arătat că adăugarea unor metaboliți secundari ai plantelor la culturile ruminale au avut efecte semnificative de scădere a emisiilor de gaz metan după 24 sau 48 de ore de incubare. Adăugarea de acid cafeic 12 mM a avut cel mai bun efect de scădere a metanului, deoarece acesta a prezentat efecte semnificative statistic și după 48 de ore de incubare. Următorul metabolit al plantelor utilizat care a avut efecte semnificative de scădere a gazului metan este acidul p-cumaric, 12 mM, acesta prezentând efecte după 24 de ore de incubare.

Efecte semnificative de diminuare a emisiilor de metan au avut și anticorpul IgY specifici, aceștia prezentând efecte după 24 ore de incubare.

S-au observat efecte semnificative și asupra emisiilor de hidrogen, dioxid de carbon și asupra concentrațiilor de acizi grași volatili, în special asupra concentrațiilor de acetat, propionat și n- și izobutirat.

Adăugarea acestor metaboliți secundari ai plantelor și a anticorpilor IgY aviari nu au avut efecte semnificative asupra pH-ului, acesta rămânând în intervalul normal ruminal. Nu s-au observat efecte semnificative statistic asupra nici unui parametru studiat când metaboliții secundari au fost adăugați în

concentrația de 6 mM. Acidul trans-cinamic și flavonoidul catechin hidrat au fost eliminați după primul experiment, tocmai pentru aceste motive.

În urma analizei T-RFLP prin care s-a dorit identificarea membrilor microorganismelor metanogene ruminale la nivel de gen, s-au putut identifica în lichidul ruminal, patru genuri de metanogeni, acestea fiind: *Methanobrevibacter* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanoculleus* sp., și DCM 1 Archaeon. S-a dovedit că gena *mcrA* este un marker pentru metanogeni iar amplificarea acesteia a fost o alegere bună. Deasemenea, enzima cu cele mai bune rezultate a fost enzima BstN, cu ajutorul căreia au fost atribuite cele mai multe fragmente.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. BERGMAN E.N, REID R.S., MURRAY M.G., BROCKWAY J.M., WHITELAW F.G., 1965, Interconversions and production of volatile fatty acids in the sheep rumen, *Biochem. J*, 97/53.
2. BRYANT M. P., 1959, Bacterial species of the rumen. *Bacteriol. Rev.*, 23:125-153.
3. CARULLA J.E., KREUZER M., MACHMÜLLER A., HESS H.D., 2005, Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep, *Australian Journal of Agricultural research*, 56:961–970.
4. COOK S.R., MAITI P.K., CHAVEZ A.V., BENCHAAAR C., BEAUCHEMIN K.A., MCALLISTER T.A., 2008, Avian (IgY) anti-methanogen antibodies for reducing ruminal methane production: *in vitro* assessment of their effects, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48:260-264.
5. GIUBURUNCĂ MIHAELA, CRISTE ADRIANA, COCAN D., CONSTANTINESCU R., RĂDUCU CAMELIA, MIREȘAN VIOARA, 2014, Effects of plant secondary metabolites on methane production and fermentation parameters in *in vitro* ruminal cultures, *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 47-2:78-82.
6. GIUBURUNCĂ MIHAELA, CRISTE ADRIANA, MIREȘAN VIOARA, 2015, Effects of p-coumaric acid on ruminal fermentation parameters in *in vitro* ruminal cultures, *Bulletin of UASVM Cluj-Napoca, Animal science and Biotech.*, 72 (1).

7. GOEL G., PUNIYA A.K., AGUILAR C.N., SINGH K., 2005, Interaction of gut microflora with tannins in feeds, *Naturwissenschaften*, 92:497-503 .
8. HASNA EL GHARRAS, 2009, Polyphenols: food sources, properties and applications—a review, *International Journal of Food Science & Technology*, 44:2512–2518.
9. JANSSEN P.H., 2010, Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics, *Anim. Feed. Sci. Tech.*, 160:1-22.
10. JAYANEGARA A., TOGTOKHBAYAR N, MAKKAR HARINDER P.S., BECKER K., 2010, Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an in vitro rumen fermentation system, *Animal Feed Science and Technology* 150:230–237.
11. LASCANO C.E. ȘI CARDENAS E., 2010, Alternatives for methane emissions mitigation in livestock systems, *R. Bras. Zootec.*, 39:175-182.
12. MARCQ C., THÉWIS A., PORTETELLE D., BECKERS Y., 2010, Keep bacteria under control: Dietary modulation of gut microflora in farm animals by use of hen egg yolk antibodies, (<http://hdl.handle.net/2268/81363>).
13. MARTIN C., MORGAVI D.P., DOREAU M., 2009, Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale, *Animal*, 1-15.
14. MIREȘAN VIOARA ȘI MIREȘAN E., 1997, Producerea cărnii de tineret ovin, *Editura Genesis, Cluj-Napoca*.
15. MIREȘAN VIOARA, ERSEK ADEL ȘI RĂDUCU CAMELIA, 2003, Fiziologia animalelor domestice, *Editura Risoprint, Cluj-Napoca*.
16. MORAN J., 2005, Tropical dairy farming: feeding management for small holder dairy farmers in the humid tropics, *Editura Landlinks*.
17. PINARES C.S., ULYATT M.J., WAGHORN G.C., LASSEY K.R., BARRY T.N., HOLMES C.W., JOHNSON D.E., 2003c, Methane emission by alpaca and sheep fed on lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. *Journal of Agricultural Science* 140:215–226.
18. PUCHALA R, MIN BR, GOETSCH A.L., SAHLU T., 2005, The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats, *Journal of Animal Science* 83:182–186.

19. SEJIAN V., LAL R., LAKRITZ J., EZEJI T., 2011, Measurement and prediction of enteric methane emission, Measurement and prediction of enteric methane emission, *Int. J. Biometeorol*, 55:1-16.
20. SIROHI S.K., PANDEY N., SINGH B., PUNYA A.K., 2010, Rumen methanogens: a review, *Indian J. Microbiol.*, 50:253-262.
21. WRIGHT A.D.G., KENNEDY P., O'NEILL C.J., TOOVEY A.F., POPOVSKI S., REA S.M., PIMM C.L., KLEIN L., 2004, Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens, *Vaccine*, 22:3976-3985.
22. ZORZOLIU C. ȘI ZORZOLIU LIVIA, 1992, Estimarea emisiei anuale de metan la bovinele din România în perioada 1938-1989. Analiză ecologică și perspectivă., *Simpozion "Factorii de mediu, producția și sănătatea taurinelor"*, Cluj-Napoca.
23. ***www.epa.gov
24. ***www.ncbi.nlm.nih.gov