
(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Solubilitatea și biodisponibilitatea ruminală a diferitelor surse de sulf și oligoelemente și efectele lor asupra activității de fermentare și cineticii de degradare ruminală și excreției minerale

Doctorand Vigh Antal Csaba

Conducători de doctorat

Prof. dr. Criste Adriana Dalila

Prof. dr. Corcionivoschi Nicolae



(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

INTRODUCERE

Rumegătoarele reprezintă o proporție semnificativă din speciile de animale domestice din întreaga lume, iar dintre animalele de interes zootehnic sunt cele mai bine adaptate pentru utilizarea și degradarea pereților celulari ai plantelor. Datorită acestei abilități, rumegătoarele sunt singurele specii de animale care nu sunt în concurență cu hrana umană (Ripple și colab., 2014; Cheng și colab., 2022). Rumegătoarele sunt capabile să degradeze și să utilizeze furaje fibroase ca sursă de energie și nutrienți datorită prezenței unei microbiote anaerobe complexe în rumen, compusă în principal din bacterii, fungii, protozoare ciliate și arhee metanogene (Henderson și colab., 2015). Microorganismele ruminale joacă roluri diferite în digestia furajelor și acționează sinergic pentru degradarea carbohidraților și proteinelor structurale și nestructurale ale plantelor (Chaucheyras-Durand și Ossa, 2014). Îmbunătățirea capacității microbiotei ruminale de a degrada peretele celular al plantelor este în general de dorit și duce de obicei la ameliorarea performanțelor animalelor (Krause și colab., 2003). Ca și în cazul altor nutrienți, satisfacerea cerințelor minerale ale microbiomului ruminal este esențială pentru o hrănire adecvată a rumegătoarelor: microorganismele necesită minerale pentru creșterea și activitatea lor (sinteza proteinelor microbiene) (Martinez, 1972). Aportul alimentar și suplimentarea cu minerale ar trebui, prin urmare, să fie optimizate pentru a susține buna funcționare a rumenului. Cu toate acestea, recomandările nutriționale pentru rumegătoare (Noziere și colab., 2018; Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 2021) se concentrează în principal pe cerințele minerale generale ale animalelor pentru întreținere, creștere și producție, în timp ce nevoile specifice pentru dezvoltarea și activitatea microbiotei ruminale sunt slab documentate. Pentru unele elemente, cum ar fi sulful (S), cerințele microbiotei ruminale (2,5 – 3,1 g / kg de materie organică degradată) sunt ușor mai mari decât cele stabilite pentru animalul gazdă (2,0 g / kg SU) (Komisarczuk Bony și Durand, 1991; Meschy, 2010). Luând în considerare oligoelementele (OM), cum ar fi manganul (Mn), zincul (Zn) și cuprul (Cu), acestea sunt minerale esențiale în nutriția animalelor, deoarece au funcții fiziologice importante: componente sau activatori ai enzimelor; participă la sinteza cheratinei, colagenului și elastinei (piele, apendice, os și cartilaj); precum și un rol important pentru sistemul imunitar și reproductiv (Hostetler și colab., 2003; Hosnedlová și colab., 2007; Sloup și colab., 2017). La rumegătoare, pe lângă aceste funcții metabolice axate pe animal, oligoelementele (Mn, Zn și Cu) pot avea unele efecte asupra microflorei ruminale, cum ar fi un efect pozitiv asupra fermentațiilor ruminale, acționând direct asupra activității enzimatic microbiene (Hilal și colab., 2016). Mai mult, studiile anterioare *in vitro* au arătat că excluderea totală sau, dimpotrivă, o doză mare (100 μg/ml mediu *in vitro*) de Mn scade semnificativ digestia celulozei ruminale, în timp ce un adaos de 5-30 μg/ml de mediu *in vitro* de Mn anorganic crește digestia celulozei (Chamberlain și Burroughs 1962; Martinez și Church 1970). În plus, digestibilitatea *in vitro* a substanței uscate

(dSU) în lichidul ruminal este îmbunătățită prin adăugarea a 100 ppm de Mn anorganic (Arelovich și colab., 2000). În ceea ce privește Zn, studiile *in vitro* mai vechi au arătat o creștere a sintezei proteinelor microbiene după aprovizionarea cu 5-7 ppm de Zn (Martínez, 1971). Într-un studiu mai recent, dSU în rumen, precum și producția totală de acizi grași volatili (tAGV) la oi a crescut în urma unei suplimentări cu 30-40 mg / kg SU de Zn anorganic (Hosseini-Vardanjani și colab., 2020). Cu toate acestea, nu toate microorganismele au aceeași sensibilitate la Zn, ceea ce ar putea avea și efecte negative. Într-un studiu timpuriu (Bonhomme și colab., 1979), s-a constatat că protozoarele tolerează o doză de 25 $\mu\text{g/ml}$ de mediu *in vitro* de Zn, în timp ce degradarea celulozei și ureei de către bacterii a scăzut foarte mult. În general, o concentrație prea mare de Zn tinde să scadă activitatea microbiană, ducând la o reducere bruscă a concentrației de amoniac (Hernández-Sánchez și colab., 2019). Studiile *in vitro* cu Cu au arătat că o doză mare de Cu anorganic (sub formă de CuSO_4) are un efect negativ asupra fermentației ruminale (Slyter și Wolin 1967), iar producția de AGV este inhibată (Arce-Cordero și colab., 2020). Cu toate acestea, o adăugare de 8 mg/kg SU de Cu anorganic (sub formă de CuSO_4) a îmbunătățit semnificativ dSU *in vitro* și a avut tendința de a crește biomasa microbiană totală (Vaswani și colab., 2017). În plus, adăugarea a 5, 7,5 și 10 mg / kg SU de Cu (sub formă de CuSO_4 înrobăt) în rația vacilor de lapte a crescut degradarea materiei organice (dMO) și a fibrelor (dNDF), precum și populațiile și activitatea bacteriilor celulolitice, cum ar fi *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* și *Fibrobacter succinogenes* (Wang și colab., 2021). Pentru rumegetoare, doza recomandată de Mn, Zn și Cu pentru acoperirea cerințelor globale ale animalelor, este de aproximativ 50, 50 și 10 mg/kg SU (Trumeau, 2014), iar limitele maxime reglementate sunt de 150, 120 și 35 mg/kg SU pentru Mn, Zn și, respectiv, Cu. (Comisia Europeană. Direcția Generală Sănătate și Siguranță Alimentară, 2022).

Pentru majoritatea speciilor, locul de absorbție al oligoelementelor este situat în intestinul subțire (Goff, 2018; Byrne și Murphy 2022). Cu toate acestea, la rumegetoare și în special în rumen, pot apărea unele interacțiuni între microorganismele, minerale și alte substanțe din rație, ceea ce duce la o absorbție redusă a mineralelor în intestin (Goff, 2018). Biodisponibilitatea intestinală a oligoelementelor din rație pentru rumegetoare este relativ scăzută, cu niveluri raportate de 4-5%, 1-4% și 15-30% pentru Cu, Mn și, respectiv, Zn (Spears, 2003; Meschy, 2007; Noziere și colab., 2018), în timp ce selectarea surselor optime pentru suplimentare este destul de dificilă. În plus, nu se cunosc nivelurile de absorbție microbiană ruminală. Din perspectiva mediului, suplimentarea animalelor de fermă cu niveluri ridicate de oligoelemente are ca rezultat o acumulare de metale în fecale și urină, ceea ce duce la creșterea emisiilor, afectând sursele de apă, dezvoltarea plantelor, precum și o apariție crescută a rezistenței antimicrobiene la animale (Brugger și Windisch 2015). În perspectiva reducerii emisiilor de metale grele din producția animală, este necesară o mai bună implementare a raționării de precizie cu oligoelemente (Lu și colab., 2017). Prin urmare, aportul alimentar și suplimentarea cu minerale ar trebui optimizate pentru a susține funcțiile ruminale adecvate, inclusiv creșterea biomasei microbiene (sinteza proteinelor microbiene) și degradarea substratului (activitatea celulolitică). Cu toate acestea, atunci când se selectează o

sursă minerală pentru includerea alimentară la rumegătoare, trebuie luată în considerare solubilitatea ruminală, deoarece biodisponibilitatea globală ar putea fi afectată de minerale cu solubilitate ridicată în rumen (Byrne și Murphy 2022). În plus, atunci când se estimează solubilitatea ruminală a diferitelor forme minerale, metoda de evaluare trebuie luată în considerare cu atenție, având în vedere că există inconsecvență în datele publicate anterior, chiar și atunci când solubilitatea a fost evaluată pentru aceleași forme minerale (Vigh și colab., 2023). Îmbunătățirea practicilor de suplimentare cu minerale la rumegătoare reprezintă o provocare importantă care ar putea îmbunătăți performanțele zootehnice și o mai bună utilizare a resurselor. O mai bună înțelegere a efectelor diferitelor forme S și oligoelemente disponibile pe piață asupra mediului ruminal ar putea sprijini specialiștii din industria nutriției animale atunci când aleg produse minerale pentru includerea în rație.

SCOPURI ȘI OBIECTIVE

Pe baza celor de mai sus, acest proiect de cercetare doctorală a urmărit să evalueze modificările induse de diferite surse de S și oligoelemente asupra mediul ruminal, digestibilității nutrienților și excreției minerale. Cercetarea a fost axată pe S și oligoelemente (Zn, Cu și Mn). Calciul (Ca) și fosforul (P) nu au fost incluse, deoarece Ca este de obicei adăugat în exces, iar P a fost deja studiat în detaliu pe parcursul unui alt program de doctorat (Bravo și colab., 2003).

Pentru realizarea scopului cercetării tezei, au fost definite mai multe obiective:

01 Dezvoltarea unui model experimental *in vitro* pentru evaluarea solubilității și biodisponibilității ruminale a sulfului și oligoelementelor, precum și a efectelor asupra mediului ruminal.

02 Evaluarea și o mai bună înțelegere a diferitelor surse anorganice de sulf privind solubilitatea și biodisponibilitatea ruminală, precum și efectele asupra activității de fermentare și microbiota ruminală.

03 Evaluarea efectelor suplimentării cu diferite surse de oligoelemente asupra fermentării, solubilității și biodisponibilității ruminale.

04 Propunerea unei ajustări a suplimentării rumegătoarelor cu sulf și oligoelemente, luând în considerare sursa și efectele mineralelor asupra funcției ruminale.

Analiza literaturii de specialitate inclusă în prima parte a acestei teze a fost publicată ca articol de tip Systematic Review în revista Agriculture (indexată ISI, având IF 3.6), iar rezultatele au fost publicate în trei articole (unul în Agriculture, revistă indexată ISI cu IF 3.6 și două în Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies, o revistă indexată BDI). De asemenea, rezultatele studiilor realizate în cadrul acestei cercetări doctorale au fost prezentate la mai multe conferințe științifice internaționale sub formă de prezentări orale sau poster (Annual Meeting of the European Association of Animal Production, 2022 – Porto, Portugalia și 2023 – Lyon, Franța; International

Symposium on the Nutrition of Herbivores, 2023 – Florianopolis, Brazilia; International Conference "Life Sciences for Sustainable Development", 2022 și 2023 – Cluj-Napoca, România).

Teza este structurată în două părți, prima parte include "INTRODUCERE" și "REVIZUIREA LITERATURII DE SPECIALITATE", descriind cele mai frecvente practici în suplimentarea sulfului și oligoelementelor la rumegătoare. Analiza literaturii de specialitate descrie importanța suplimentării rumegătoarelor cu sulf (S) și oligoelemente (TM), inclusiv cupru (Cu), mangan (Mn) și zinc (Zn) pentru a acoperi cerințele în continuă evoluție pentru creștere, producție și reproducție. În plus, formele minerale disponibile pe piață, cum ar fi TM anorganică (ITM), organică (OTM) sau hydroxy (HTM), sunt analizate în ceea ce privește solubilitatea ruminală și efectele asupra mediului ruminal (fermentație, degradabilitatea și biodisponibilitatea nutrienților și populațiile microbiene), concentrându-se asupra relației dintre sursa minerală și funcția ruminală. În această parte sunt discutate, de asemenea, metodele *in vitro* și *in vivo* existente pentru evaluarea solubilității ruminale a mineralelor. Partea a doua a tezei este alcătuită din șapte capitole, "Capitolul II, Capitolul III, Capitolul IV, Capitolul V, Capitolul VI, Capitolul VII și Capitolul VIII", care prezintă și discută rezultatele cercetărilor obținute pe parcursul studiilor doctorale.

În al treilea capitol (Capitolul III.) sunt prezentate detalii privind dezvoltarea unui model *in vitro* pentru evaluarea solubilității ruminale și a biodisponibilității mineralelor și a efectelor acestora asupra parametrilor de fermentare ruminală. Capitolul III. constă din alte cinci subcapitole care acoperă o secțiune de introducere (3.1.), materiale și metode (3.2.), rezultate (3.3.), discuții (3.4.) și concluzii (3.5.). Subcapitolul materiale și metode (3.2.) este împărțit în alte șase secțiuni (de la 3.2.1. la 3.2.6.), în timp ce subcapitolul rezultate (3.3.) este prezentat în două secțiuni distincte (3.3.1 și 3.3.2.). Accentul în timpul studiilor metodologice prezentate în capitolul III. a fost asupra stabilirii condițiilor de fermentare *in vitro* având la bază incubarea unui substrat deficitar în S într-un suc ruminal tamponat în care activitatea florei microbiene este sensibilă la suplimentarea cu S (sursa de referință pentru S a fost sulful elementar cu un conținut de S de >97%, adăugat în doze crescute [0,25 și 0,50 % SU] la început, după 24 de ore și 48 de ore de incubare) și identificarea fracțiunilor (particule mari [UNSOL], conținând particule nedegradate de furajere, protozoare și minerale insolubilizate; fracțiunea îmbogățită în bacterii [BACT], conținând în principal bacterii ruminale; și un supernatant final [SOL], conținând S solubilizat) în care S suplimentar ar fi găsit după o fermentație de 70 de ore. Activitatea de fermentare a fost măsurată prin producția totală de gaze (PTG, ml/g SU), rata de producție a gazului (rata PG, ml/h), degradabilitatea substanței uscate a substratului (dSU%), pH-ul, producția de acizi grași volatili (AGV, mM/kg), azot amoniacal (NH₃-N, mg/dl) și sinteza proteinelor microbiene evaluate printr-o analiză a acidului diaminopimelic (DAPA). Solubilitatea minerală a fost evaluată prin analiza concentrației de S în fracțiunile (UNSOL, BACT și SOL) obținute după centrifugări succesive ale mediului de fermentație finală. Conform rezultatelor înregistrate în timpul celor 3 incubări consecutive realizate în acest studiu, adăugarea a 0,50% SU de

S după 48 de ore de incubație părea a fi cea mai interesantă în scopul studierii răspunsului activității de fermentație *in vitro* a microorganismelor cu suplimentarea cu S. De asemenea, adăugarea de 0,5% SU de S la începutul incubării ar putea fi interesant de păstrat ca tratament de lucru, deoarece a permis compararea timpului de suplimentare. În plus, modelul *in vitro* dezvoltat în timpul acestui studiu poate fi utilizat pentru evaluarea solubilității ruminale a altor minerale, inclusiv Mn, Zn și Cu, luând în considerare următoarele proceduri: separarea mediului final de fermentație (după 70 de ore de fermentare) prin centrifugări multiple: la $100\times g$ (5 min la $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), pentru a separa o fracțiune insolubilă (UNSOL, conținând particule nedegradate de furajere, protozoare și minerale insolubilizate); supernatantul obținut este apoi centrifugat în continuare la $18\ 500\times g$ (20 min la $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pentru a separa o fracțiune îmbogățită cu bacterii (BACT) și un supernatant final (SOL), conținând numai minerale solubilizate; și apoi se analizează concentrația minerală a fiecărei fracțiuni de centrifugare. Apoi, solubilitatea ruminală a mineralelor poate fi exprimată ca procent din mineralul solubilizat în supernatantul final (pe baza mineralului total analizat în diferitele fracțiuni de centrifugare).

Următorul capitol (Capitolul IV) descrie efectele diferitelor surse de S asupra biodisponibilității ruminale a S, activității de fermentare și populațiilor microbiene măsurate utilizând modelul *in vitro* descris în Capitolul III. Ca și capitolul anterior, capitolul IV. este împărțit în alte cinci subcapitole care acoperă o introducere (4.1.), materiale și metode (4.2.), rezultate (4.3.), discuții (4.4) și concluzii (4.5.). Subcapitolul materiale și metode (4.2.) este împărțit în alte șase secțiuni (de la 4.2.1. la 4.2.6.), în timp ce rezultatele (4.3.) sunt prezentate în trei secțiuni distincte (de la 4.3.1 la 4.3.3.). Scopul acestui studiu (publicat ca și articol științific) a fost de a înțelege mai bine solubilitatea ruminală, biodisponibilitatea, efectele asupra fermentației și microbiotei diferitelor surse de S. Fermentațiile *in vitro* cu suc ruminal au fost efectuate timp de 70 de ore. Fânul (substrat deficitar în S) a fost incubat fără nicio suplimentare (CON), sau cu 0,5% SU de S, sub formă de: sulf elementar (ES), Na_2SO_4 (NaS), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NHS) și MgSO_4 (MgS). Activitatea de fermentare a fost evaluată prin producția totală de gaze (PTG, măsurare continuă) și degradabilitatea substanței uscate (dSU%). Solubilitatea și biodisponibilitatea au fost estimate prin concentrația de S a supernatantului (SOL) și a bacteriilor (BACT). Comunitatea microbiană a fost evaluată prin amplificarea genei 16SrRNA. NHS a scăzut ($p<0,05$), ES și NaS nu au afectat, în timp ce MgS a crescut ($p<0,01$) PTG. MgS a crescut ($p<0,001$), în timp ce ES, NaS și NHS nu au arătat niciun efect asupra dSU%. Sursele de sulfat (NaS, NHS și MgS) au crescut ($p<0,001$), în timp ce ES nu a afectat conținutul de S al SOL. Conținutul de S al BACT sugerează că sulfații au o biodisponibilitate ridicată, în timp ce ES este slab asimilat de către bacterii. Au fost observate unele variații în populațiile microbiene, inclusiv o abundență mai scăzută de metanogeni cu toate sursele de S și o abundență mai ridicată de *Desulfovibrio* cu MgS. Rezultatele acestui studiu indică faptul că NaSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și MgSO_4 sunt foarte solubile în rumen, în timp ce sulful elementar are o solubilitate scăzută. În plus, sursele mai solubile de sulfat de S par a fi mai bine asimilate de către bacteriile ruminale comparativ cu ES, prin urmare, prezintă o biodisponibilitate mai ridicată. În ceea ce

privește funcția rumenului, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pare să aibă un efect negativ asupra fermentației ruminale, ES nu are niciun efect semnificativ, în timp ce NaSO_4 și MgSO_4 pot îmbunătăți parametrii specifici de fermentație. Analiza populațiilor microbiene indică faptul că S ar putea avea un impact asupra abundenței unor bacterii specifice, totuși incubările de 70 de ore utilizate în acest studiu probabil nu prezintă condițiile optime recomandate pentru analiza diversității microbiene.

Următorul capitol (Capitolul V.) prezintă evaluarea efectelor surselor anorganice de sulf asupra degradării ruminale a furajelor și microbiotei ruminale măsurate printr-un model *in situ*. Capitolul V. este împărțit în cinci subcapitole care acoperă o introducere (5.1.), materiale și metode (5.2.), rezultate (5.3.), discuții (5.4.) și concluzii (5.5.). Subcapitolul materiale și metode (5.2.) este împărțit în alte cinci secțiuni (de la 5.2.1. la 5.2.5.), în timp ce rezultatele (5.3.) sunt prezentate în două secțiuni distincte (5.3.1 și 5.3.2.). Acest studiu *in vivo* a avut ca scop evaluarea efectelor includerii surselor anorganice de S (sulf elementar și MgSO_4) în rație la rumegătoare asupra cineticii degradării ruminale a furajelor (fân de iarbă de Bermuda și siloz de porumb), precum și modificări ale populațiilor microbiene ruminale. Urmând un design de pătrat latin, șase boi Nellore echipați cu canulă ruminală (greutate vie în medie 943 ± 96 kg) au fost împărțiți în trei tratamente experimentale: fără suplimentarea cu S (CON) și suplimentarea cu 0,05% SU aport de S/zi fie cu sulf elementar (ES), fie cu sulfat de magneziu (MgSO_4). Perioadele experimentale au inclus 2 săptămâni pentru adaptarea animalelor la tartament, urmate de 2 săptămâni pentru incubarea substratului (fân și siloz) în rumen. Cinetica degradării SU și a NDF-ului din furaje a fost evaluată folosind tehnica standardizată a sacului de nailon, în timp ce compoziția comunității microbiene ruminale a fost evaluată prin extracția ADN-ului și secvențierea genei 16S rRNA. Degradarea SU a fânului a crescut semnificativ cu MgSO_4 comparativ cu CON și ES ($p < 0,05$), dar nu s-a observat niciun efect semnificativ asupra degradării SU a porumbului însilozat. MgSO_4 a crescut semnificativ degradarea NDF a fânului în comparație cu CON și ES ($p < 0,05$), în timp ce ES a scăzut degradarea NDF a porumbului însilozat ($P < 0,05$). În ceea ce privește modificările populațiilor microbiene, nu s-au înregistrat diferențe semnificative între tratamentele privind diversitatea alfa și beta. Cu toate acestea, suplimentarea cu S a arătat efecte semnificative asupra unor comunități microbiene specifice, cum ar fi: abundența absolută a *Archaea* metanogenă a fost semnificativ ($p < 0,01$) mai scăzută în grupurile suplimentate cu S în comparație cu CON, indiferent de sursa de S; abundența populației de *Desulfovibrio* a crescut semnificativ prin suplimentarea cu MgSO_4 , în timp ce ES nu a arătat niciun efect semnificativ în comparație cu CON. În ceea ce privește bacteriile fibrolitice, populația genului *Fibrobacter* a fost semnificativ mai crescută ($p < 0,05$) pentru animalele suplimentate cu S, în timp ce *Ruminococcus* nu diferă în comparație cu CON. Rezultatele acestui studiu indică faptul că suplimentarea rațiilor la rumegătoare având ca bază furaje grosiere cu până la 0,30% SU de S (o creștere de 0,05 - 0,10% SU peste doza recomandată de 0,20% SU), folosind o sursă de S foarte solubilă în rumen, poate îmbunătăți degradarea substratului și eficacitatea fermentației ruminale. În plus, includerea în rație a unei surse biodisponibile de S ar putea avea un impact benefic nu numai asupra funcțiilor ruminale specifice, cum ar fi

activitatea bacteriilor fibrolitice, ci și asupra modulării populațiilor metanogene cu potențialul de a reduce producția de metan enteric.

Următorul capitol (Capitolul VI.) descrie solubilitatea ruminală și biodisponibilitatea surselor anorganice de oligoelemente și efectele lor asupra activității de fermentare măsurate utilizând modelul *in vitro* descris în Capitolul III. Capitolul VI. este împărțit în alte cinci subcapitole care acoperă o introducere (6.1.), materiale și metode (6.2.), rezultate (6.3.), discuții (6.4) și concluzii (6.5.). Subcapitolul materiale și metode (6.2.) este împărțit în alte șase secțiuni (de la 6.2.1. la 6.2.6.), subcapitolul rezultate (6.3.) în trei secțiuni (de la 6.3.1 la 6.3.3.), în timp ce subcapitolul discuții (6.4) în alte trei secțiuni (de la 6.4.1. la 6.4.3.). Scopul acestui studiu (publicat și ca articol științific) a fost de a evalua efectele suplimentării cu surse anorganice de mangan (MnO , $MnSO_4$), zinc (ZnO , $ZnSO_4$) și cupru ($CuSO_4$) în diferite niveluri (0,06% SU pentru Mn; 0,05% SU pentru Zn; 0,01 și 0,05% SU pentru Cu) asupra fermentației, solubilității și biodisponibilității ruminale măsurate *in vitro*. Activitatea de fermentare a fost măsurată prin producția totală de gaze (PTG) și degradabilitatea substanței uscate după 70 de ore de fermentare (dSU%). Solubilitatea oligoelementelor a fost estimată prin concentrația minerală în supernatantul mediului final de fermentație (SOL), în timp ce biodisponibilitatea din concentrația minerală într-o fracțiune îmbogățită în bacterii (BACT). Mn (indiferent de sursă) și ZnO au avut tendința ($p < 0,10$) să scadă, în timp ce Cu nu a arătat niciun efect semnificativ asupra PTG. Adăugarea de Mn anorganic (indiferent de sursă) și de ZnO a avut tendința de a scădea ($p < 0,10$), $ZnSO_4$ a avut tendința de a crește ($p < 0,10$), în timp ce Cu nu a arătat niciun efect asupra dSU%. În ceea ce privește solubilitatea, Mn (MnO și $MnSO_4$), $ZnSO_4$ și $CuSO_4$ au crescut semnificativ ($p < 0,05$, $p < 0,001$ și $p < 0,01$), în timp ce ZnO nu a afectat conținutul în oligoelemente a SOL. Aceste rezultate indică faptul că $MnSO_4$, $ZnSO_4$ și $CuSO_4$ sunt foarte solubile, MnO este destul de solubil, în timp ce ZnO are o solubilitate scăzută în rumen. Pe baza conținutului în oligoelemente din BACT, MnO, $MnSO_4$ și $CuSO_4$ au o biodisponibilitate ridicată, în timp ce ZnO este slab asimilat de bacteriile ruminale. Cu toate acestea, lipsa unei inhibări clare sau a îmbunătățirii fermentațiilor sugerează că microbiota ruminală are o cerință scăzută pentru suplimentarea cu oligoelemente.

În ultimul capitol (Capitolul VII.), se face o descriere a efectelor suplimentării cu doze scăzute de oligoelemente organice asupra excreției minerale și a stării minerale fiziologice la rumegătoarele mici. Capitolul VII. este împărțit în alte cinci subcapitole care acoperă o introducere (7.1.), materiale și metode (7.2.), rezultate (7.3.), discuții (7.4) și concluzii (7.5.). Subcapitolul materiale și metode (7.2.) este împărțit în alte trei secțiuni (de la 7.2.1. la 7.2.3.), în timp ce subcapitolul rezultate (7.3.) în patru secțiuni (de la 7.3.1 la 7.3.4.). Scopul acestui studiu (publicat și ca articol științific) a fost de a investiga efectele înlocuirii suplimentării cu oligoelemente anorganice (ITM) de Mn, Zn și Cu prin doze egale sau mai scăzute de oligoelemente organice (OTM) asupra stării minerale și excreției minerale la oi. În urma unui design pătrat latin, nouă berbeci castrați au fost împărțiți în trei tratamente experimentale:

suplimentarea fie cu ITM (INORG), fie cu OTM (ORG) urmând nivelurile de suplimentare recomandate și OTM la o doză redusă (ORGLow). După o perioadă de adaptare, probele de fecale, urină și sânge au fost colectate timp de 12 zile în standuri metabolice. Conținutul seric în minerale a arătat diferențe numai pentru Cu, care a fost semnificativ mai crescută ($p < 0,01$) cu ORGLow comparativ cu INORG și ORG. Excrețiile minerale fecale totale zilnice au fost reduse cu ORGLow comparativ cu INORG sau ORG. Rezultatele acestui studiu sugerează că suplimentarea rumegătoarelor mici cu o doză scăzută de OTM poate reduce semnificativ excreția minerală fără un efect negativ asupra stării minerale fiziologice a animalelor. Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare pe termen lung pentru a evalua mobilizarea mineralelor din depozitele corporale în timpul suplimentării cu doze scăzute de OTM.

CONCLUZII GENERALE

Luând în considerare suplimentarea mineralelor la rumegătoare, în special atunci când vine vorba de elemente precum S, Mn, Zn și Cu, este necesară o atenție deosebită în selectarea sursei minerale potrivite, având în vedere că solubilitatea lor în rumen este strâns legată de funcția rumenului (fermentație, degradarea substratului, interacțiunile dintre microorganisme), absorbția intestinală a mineralelor și excreția mineralelor în fecale.

Primul pas al acestei cercetări doctorale a fost dezvoltarea unui model *in vitro* pentru a evalua solubilitatea ruminală a diferitelor minerale. Pe baza rezultatelor obținute după numeroase incubări folosind lichidul ruminal ca și inocula, s-a ajuns la concluzia că una dintre cele mai relevante metode de evaluare a solubilității ruminale a S, Mn, Zn și Cu se bazează pe separarea mediului final de fermentație (după 70 de ore de fermentație) prin centrifugări multiple. Prima centrifugare este efectuată la $100 \times g$ (5 min la $4^\circ C$), pentru a separa o fracțiune insolubilă, care conține particule de furaje nedegradate, protozoare și minerale insolubilizate). Supernatantul obținut este în continuare centrifugat la $18.500 \times g$ (20 min la $4^\circ C$) pentru a separa o fracțiune îmbogățită în bacterii și un supernatant final, conținând numai minerale solubilizate. Se analizează apoi concentrația minerală a fiecărei fracțiuni de centrifugare. Pe urmă, solubilitatea ruminală a S, Mn, Zn și Cu poate fi exprimată ca procent din mineralul solubilizat în supernatantul final, pe baza conținutului total de minerale analizat în diferitele fracțiuni de centrifugare. Mai mult, concentrația în oligoelemente a fracțiunii îmbogățite cu bacterii ar putea fi un indicator al biodisponibilității globale, deoarece oligoelementele (% din cantitatea totală) asimilate de către bacteriile ruminale păreau să fie în relație cu absorbția aparentă intestinală a oligoelementelor la rumegătoare.

Folosind modelul *in vitro* menționat mai sus, a fost evaluată solubilitatea ruminală a mai multor surse anorganice de S. Rezultatele acestui studiu indică faptul că $NaSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ și $MgSO_4$ sunt foarte solubile în rumen, în timp ce sulful elemental (ES) are o solubilitate scăzută. Având în vedere solubilitatea lor ridicată, sursele de sulfat ($-SO_4$) de S par a fi mai bine asimilate de către bacteriile ruminale comparativ cu ES, sugerând o biodisponibilitate mai ridicată în rumen. Pe baza parametrilor de fermentare măsurați *in vitro* (PTG, dSU, PF), se poate evidenția faptul că $(NH_4)_2SO_4$ are un efect negativ asupra funcționării rumenului, ES nu afectează, în timp ce $NaSO_4$ și

MgSO₄ pot îmbunătăți parametrii specifici de fermentație. Studiul *in vivo* cu boi canulați ruminal, cu o suplimentare a rației fie cu MgSO₄, fie cu ES peste nivelurile recomandate a confirmat efectul pozitiv al unei surse de S foarte solubil în rumen (MgSO₄) asupra funcționării rumenului, promovând nu numai o degradare mai crescută a substratului (SU și NDF), ci și un impact benefic asupra populațiilor microbiene specifice, cum ar fi bacteriile fibrolitice. În plus, analiza microbiotei ruminale a sugerat că S-ul, indiferent de sursă (ES sau -SO₄), ar putea avea un rol pozitiv în modularea populațiilor metanogene cu potențialul de a reduce producția metan enteric.

Pe baza studiilor *in vitro* prin care s-a evaluat solubilitatea ruminală a surselor anorganice de Mn, Zn și Cu, s-a observat că MnSO₄, ZnSO₄ și CuSO₄ sunt foarte solubile în rumen, MnO este destul de solubil, în timp ce ZnO are o solubilitate scăzută. În plus, sursele de oligoelemente mai solubile de -SO₄ par a fi mai bine asimilate de către bacteriile ruminale în comparație cu formele de oxid, prezentând prin urmare, o biodisponibilitate potențial mai crescută. Cu toate acestea, pe baza rezultatelor studiilor *in vitro*, dozele crescute de oligoelemente anorganice, indiferent de sursă (oxizi sau sulfati), par să aibă un efect negativ asupra activității de fermentare a rumenului, cum ar fi producția totală de gaze, degradabilitatea substanței uscate și sinteza proteinelor microbiene.

Rezultatele evidențiate în acest studiu doctoral sugerează că rumegetoarele ar putea fi suplimentate cu o doză redusă de oligoelemente organice comparativ cu oligoelementele anorganice la nivelurile recomandate de sistemele nutriționale, prezentând o strategie viabilă în atenuarea excreției minerale în mediu. În plus, nivelurile de suplimentare redusă de oligoelemente nu au prezentat efecte negative asupra digestibilității nutrienților și nu au compromis starea minerală fiziologică a animalelor.

RECOMANDĂRI

Având în vedere rezultatele obținute în urma studiilor realizate pe parcursul acestui program de cercetare doctorală, modul *in vitro* bazat pe suc ruminal este relevant pentru evaluarea solubilității ruminale a mineralelor, dar nu este cel mai potrivit pentru efectuarea de observații asupra florei microbiene din rumen, în special când se realizează o suplimentare cu sulf și oligoelemente. Pentru acestea din urmă, modelele *in vivo* sunt mai potrivite.

Rezultatele acestui studiu doctoral indică faptul că suplimentarea rațiilor compuși în principal de furaje grosiere la rumegetoare cu până la 0,30% SU de S (peste nivelurile de 0,20% recomandat către sistemele nutriționale), folosind o sursă de S foarte solubilă în rumen, poate îmbunătăți degradarea substratului și eficacitatea fermentației ruminale. Cu toate acestea, se recomandă studii suplimentare la rumegetoare, suplimentate cu surse de sulf foarte solubile în rumen, care acoperă cerințele microbiotei ruminale în S (mai mari decât cerințele animalelor gazdă) și efectele asupra biodisponibilității diferitelor oligoelemente (anorganice și/sau organice la doze de suplimentare recomandate și reduse), având în vedere că S este

unul dintre principalii antagoniști ai Cu, Mn și Zn în ceea ce privește absorbția intestinală. În plus, sunt necesare studii suplimentare pe termen lung pentru a evalua mobilizarea mineralelor din depozitele corporale în timpul suplimentării cu doze scăzute de oligoelemente organice la rumegătoare.

1. Arce-Cordero JA, Monteiro HF, Lelis AL, Lima LR, Restelatto R, Brandao VLN, et al. Copper sulfate and sodium selenite lipid-microencapsulation modifies ruminal microbial fermentation in a dual-flow continuous-culture system. *J Dairy Sci.* 2020 Aug;103(8):7068–80.
2. Arelovich HM, Owens FN, Horn GW, Vizcarra JA. Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake, and digestion by cattle fed prairie hay and urea. *J Anim Sci.* 2000 Nov;78(11):2972–9.
3. Bonhomme A, Durand M, Dumay C, Beaumatin P. Etude in vitro du comportement des populations microbiennes du rumen en présence de zinc sous forme de sulfate. *Ann Biol anim Bioch Biophys.* 1979;19(3B):937–42.
4. Bravo D, Sauvant D, Bogaert C, Meschy F. III. Quantitative aspects of phosphorus excretion in ruminants. *Reproduction, nutrition, development.* 2003 May 1;43:285–300.
5. Brugger D, Windisch WM. Environmental responsibilities of livestock feeding using trace mineral supplements. *Animal Nutrition.* 2015 Sep 1;1(3):113–8.
6. Byrne L, Murphy RA. Relative Bioavailability of Trace Minerals in Production Animal Nutrition: A Review. *Animals.* 2022a Jan;12(15):1981.
7. Byrne L, Murphy RA. Relative Bioavailability of Trace Minerals in Production Animal Nutrition: A Review. *Animals.* 2022b Jan;12(15):1981.
8. Chamberlain CC, Burroughs W. Effect of Fluoride, Magnesium and Manganese Ions on in Vitro Cellulose Digestion by Rumen Microorganisms¹. *Journal of Animal Science.* 1962 Aug 1;21(3):428–32.
9. Chaucheyras-Durand F, Ossa F. REVIEW: The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *The Professional Animal Scientist.* 2014 Feb 1;30(1):1–12.
10. Cheng L, Zhang X, Reis S, Ren C, Xu J, Gu B. A 12% switch from monogastric to ruminant livestock production can reduce emissions and boost crop production for 525 million people. *Nat Food.* 2022 Dec;3(12):1040–51.
11. European Commission. Directorate General for Health and Food Safety. European Union register of feed additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003. Annex I, List of additives [Released date 06.12.2022] . [Internet]. LU: Publications Office; 2022 [cited 2023 Feb 26]. Available from: <https://data.europa.eu/doi/10.2875/110483>
12. Goff JP. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *Journal of Dairy Science.* 2018 Apr 1;101(4):2763–813.
13. Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Janssen PH. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci Rep.* 2015 Oct 9;5:14567.
14. Hernández-Sánchez D, Cervantes-Gómez D, Ramírez-Bribiesca JE, Cobos-Peralta M, Pinto-Ruiz R, Astigarraga L, et al. The influence of copper levels on in vitro ruminal fermentation, bacterial growth and methane production. *J Sci Food Agric.* 2019 Feb;99(3):1073–7.
15. Hilal E, Elkhairy M, Osman A. The Role of Zinc, Manganese and Copper in Rumen Metabolism and Immune Function: A Review Article. *Open Journal of Animal Sciences.* 2016 Jan 1;06:304–24.
16. Hosnedlová B, Travnicek J, Šoch M. Current view of the significance of zinc for ruminants: A review. *Agricultura tropica et subtropica.* 2007 Jan 1;40:57–64.
17. Hosseini-Vardanjan SF, Rezaei J, Karimi-Dehkordi S, Rouzbehan Y. Effect of feeding nano-ZnO on performance, rumen fermentation, leukocytes, antioxidant capacity, blood serum enzymes and minerals of ewes. *Small Ruminant Research.* 2020 Oct 1;191:106170.

18. Hostetler CE, Kincaid RL, Mirando MA. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *The Veterinary Journal*. 2003 Sep 1;166(2):125-39.
19. Komisarczuk Bony S, Durand M. Effects of minerals on microbial metabolism. INRA; 1991.
20. Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003 Dec 1;27(5):663-93.
21. Lu L, Liao X dong, Luo X gang. Nutritional strategies for reducing nitrogen, phosphorus and trace mineral excretions of livestock and poultry. *Journal of Integrative Agriculture*. 2017 Dec 1;16(12):2815-33.
22. Martínez A. Effect of some major and trace element interactions upon in vitro rumen cellulose digestion. In *Journal animal science*; 1971. p. 982-90.
23. Martinez A. Effect of some major and trace element interactions upon in vitro rumen cellulose digestion. Oregon State University; 1972.
24. Martinez A, Church DC. Effect of various mineral elements on in vitro rumen cellulose digestion. *J Anim Sci*. 1970 Nov;31(5):982-90.
25. Meschy F. Alimentation minérale et vitaminique des ruminants : actualisation des connaissances. INRAE Productions Animales. 2007 Jun 7;20(2):119-28.
26. Meschy F. Mineral nutrition of ruminants. Quae. Versailles, France: Quae; 2010.
27. Noziere P, Sauvant D, Delaby L, Inra. Inra, 2018. Alimentation des ruminants. Editions Quae; 2018. p. 728 p.
28. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Washington, D.C.: National Academies Press; 2021.
29. Ripple WJ, Smith P, Haberl H, Montzka SA, McAlpine C, Boucher DH. Ruminants, climate change and climate policy. *Nature Clim Change*. 2014 Jan;4(1):2-5.
30. Sloup V, Jankovská I, Nechybová S, Peřinková P, Langrova I. Zinc in the Animal Organism: A Review. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 2017 Mar 1;48:13-21.
31. Slyter LL, Wolin MJ. Copper sulfate-induced fermentation changes in continuous cultures of the rumen microbial ecosystem. *Appl Microbiol*. 1967 Sep;15(5):1160-4.
32. Spears JW. Trace Mineral Bioavailability in Ruminants. *The Journal of Nutrition*. 2003 May 1;133(5):1506S-1509S.
33. Trumeau D. Les oligo-éléments en élevage bovin. Analyse descriptive des profils métaboliques en oligo-éléments établis en laboratoire d'analyse et liens avec les aspects cliniques. [ONIRIS, Nantes, France]; 2014.
34. Vaswani S, Sidhu VK, Roy D, Kumar M, Kushwaha R. Effect of Copper Supplementation on In -vitro Rumen Fermentation Characteristics. *International Journal of Livestock Research*. 2017 Jan 1;16(5):63-5.
35. Vigh A, Criste AD, Corcionivoschi N, Gerard C. Rumen Solubility of Copper, Manganese and Zinc and the Potential Link between the Source and Rumen Function: A Systematic Review. *Agriculture*. 2023 Dec;13(12):2198.
36. Wang C, Han L, Zhang GW, Du HS, Wu ZZ, Liu Q, et al. Effects of copper sulphate and coated copper sulphate addition on lactation performance, nutrient digestibility, ruminal fermentation and blood metabolites in dairy cows. *British Journal of Nutrition*. 2021 Feb;125(3):251-9.

