SINTESIS DE PROTEINA MICROBIANA EN VACAS LECHERAS: EVALUACION DE DIFERENTES METODOS DE ESTUDIO.

Balcells, J., González-Ronquillo, M., Belenguer A. y Guada, J. A.
Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza.

INTRODUCCION

Tradicionalmente la producción de proteína microbiana en el rúmen ha sido determinada mediante la cuantificación del flujo de proteína total y la de un marcador microbiano en el quimo. Ello requiere la utilización de animales canulados en el duodeno o abomaso. Los ácidos nucleicos o sus metabolitos, las bases púricas (BP), son las sustancias mas comúnmente utilizadas como marcadores microbianos (ARC, 1984), estas sustancia son, además, absorbidas y metabolizadas parcialmente (DP,i.e. alantoína y ácido úrico) y en esta forma excretadas en orina pero también a través de la glándula mamaria.

La relación entre la absorción duodenal de BP y la excreción urinaria de sus derivados metabólicos a sido descrita en diversas especies y situaciones productivas que incluyen animales en lactación (González-Ronquillo *et al.* 2003), para así disponer de una herramienta que permita estimar el flujo duodenal de proteína microbiana sin la agresividad que implican los procedimientos de canulación. Por otra parte, en animales en lactación ha sido descrita también la relación entre flujo duodenal y excreción láctea de purinas (Giesecke *et al.* 1994) pensando en una posible sustitución de la orina por la leche, asumiendo una mayor facilidad de recolección y control de este último elemento.

El objetivo del presente trabajo es determinar la producción de proteína microbiana en vacas en lactación con los procedimientos actualmente disponibles y analizar las diferencias registradas derivadas del método de determinación.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron tres vacas lecheras cruces de Holstein y Friesian, multíparas (3ª lactación) con un peso vivo medio de 558 ± 14 Kg. Los animales disponían de una cánula simple en el saco dorsal del rúmen y una cánula tipo "T" en la parte más craneal del duodeno. Los animales se mantuvieron atados con collar en plaza fija y fueron ordeñados dos veces al día a las 8.00 y a las 17.00 h. La ración mixta (50/50 forraje/concentrado) fue administrada en doce tomas diarias y estuvo compuesta, el forraje, 67 % heno de Veza-Avena, 22 % heno de alfalfa y un 11 % de pulpa de remolacha, el concentrado por 33.7 % cebada, 30 % maíz, 25.5 soja y un 10.2 % de salvado. El tratamiento experimental consistió en administrar la ración "ad libitum" y aplicando dos niveles de restricción el 15 y 25 %, respectivamente. Los tratamientos se aplicaron siguiendo un cuadrado latino 3x3 y cada periodo experimental tuvo una duración de un mes, del cual la primera quincena se destinó a la adaptación de los animales al tratamiento experimental mientras que en el resto se realizaron las determinaciones experimentales.

La producción microbiana se determinó mediante los procedimientos convencionales estimado el flujo duodenal (Faichney *et al.* 1975) e identificando la proteína microbiana en el quimo mediante dos marcadores, uno natural las BP y otro isotópico el ^{15}N. La producción microbiana se estimó también de forma indirecta a partir de la excreción

urinaria y láctea de DP utilizando sendo modelos propuestos por González-Ronquillo *et al.* (2003). Las concentraciones de los marcadores (Cr-Yb) en el quimo y en las soluciones de infusión se determinaron por espectrofotometría de masas. Los DP y creatinina en orina digesta y leche se determinaron por HPLC (Balcells *et al.*, 1992).

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 1. Flujo duodenal de N, nitrógeno no amoniacal (NNA) BP así como la producción de N microbiano (g/d) estimado de forma directa a partir del enriquecimiento de ^{15}N o el flujo duodenal de BP o de forma indirecta a partir de la excreción urinaria o láctea de DP. Los valores se presentan utilizando la composición de las bacterias asociadas a la fase sólida (BAS) o líquida (BAL).

	Nivel de restricción							
	Ad libitum	*15 %*	*25%*	ESM_1	Sig/Dieta	Media	ESM	Sig/Met
Producción leche (Kg/d)	18.3	20.3	20.3	0.96	NS			
Ingestión MOD (Kg/d)	10.5	13.92	20.3	0.16	**			
Flujo duodenal								
Nitrógeno (g/d)	245.5	200.9	208.5	22.97	NS	218.3		
NNA (g/d)	222.7	186.3	181.9	22.69	NS	196.9		
Bases Púricas Cr-Yb	258.2	216.1	193.6	39.31	NS	222.6	36.03	NS
" " DP orina	314.0	290.7	266.5	13.95	*	290.3		
" " DP leche	236.0	231.2	249.0	25.03	NS	238.0		
Nitrógeno Microbiano								
^{15}N (BAL)	152.4							
(BAS)	194.0							
Bases Púricas								
Cr-Yb (§) (BAL)	131.5	123.6	84.1	31.93	NS	113.0	53.09	***
(BAS)	191.7	142.2	170.4	36.24	NS	168.1	36.03	*
DP Orina† (BAL)	167.5	160.8	115.4	15.73	0.059	147.9		
(BAS)	251.6	192.6	232.9	19.71	NS	225.7		
DP Leche†† (BAL)	115.5	125.2	111.4	8.34	NS	117.4		
(SAB)	180.8	154.0	211.2	10.44	0.095	182.0		

ESM_1: Error estándar que corresponde a la interacción An.x Per. y contra el que se comparó el efecto dieta.
ESM_2: Error estándar residual
§ Valores calculados a partir del sistema de doble marcado propuesto por (Faichney, 1975)
Valores calculados a partir del modelo propuesto por González Ronquillo *et al.*, (2003) a partir de la excreción urinaria de DP en orina† [$y = 58.86 + 0.69\ x$] y leche †† [$y = -5.14 + 0.3765x_1 + 0.011x_2$].

En la tabla 1 se presentan las variaciones registradas en la ingestión de MOD que fueron un reflejo de la restricción a la que fueron sometidos los animales experimentales. Los niveles de producción de leche no fueron modificados por el tratamiento experimental y con ello se consiguió mantener los niveles de producción limitando los niveles de ingestión y consecuentemente la síntesis de proteína microbiana en el retículo-rumen.

El flujo duodenal de N, NNA, BP y nitrógeno de origen microbiano se presentan en la tabla 1. Los flujos de N microbiano fueron siempre inferiores cuando fueron calculados utilizando las bacterias asociadas a la fase líquida, como consecuencia de la mayor relación BP/N determinada en dichos extractos (1.36 y 2.09 para las BAS y BAL, respectivamente P< 0.001). Estas diferencias en la composición química de los extractos confirman resultados previos descritos en bibliografía y estarían relacionados con diferencias en la actividad metabólica entre ambos extractos o con variaciones inducidas por una hipotética selección realizada durante el proceso de extracción de las BAS (Martín-Orúe *et al.*, 1998).

Cuando los animales fueron alimentados "*ad libitum*", la contribución microbiana al N duodenal estuvo determinada por el método de estudio, así el 68 %, 59%, 75% o el 51 % (P<0.001) del N fue de origen microbiano (BAL) cuando el ^{15}N o las BP fueron utilizados como marcadores duodenales o el flujo de BP fue estimado a partir de la excreción de DP a través de la orina o la leche. En relación al efecto del tratamiento experimental sobre los diferentes parámetros a estudio, el flujo duodenal de BP respondió al tratamiento experimental disminuyendo con el nivel de restricción. Sin embargo, las diferencias no alcanzaron en ningún caso significación estadística debido a la elevada variación residual registrada en este parámetro (CV= 23 %) considerando que la máxima variación esperable sería aquella equivalente al nivel de restricción impuesto (25 %). La excreción urinaria de DP fue un reflejo del flujo duodenal de DP y disminuyó con el tratamiento experimental, en este caso la variación residual fue muy inferior (CV= 5%) y por tanto las diferencias en la estimación del flujo duodenal de BP alcanzaron significación estadística (P<0.05). Al expresar dichos resultados en términos de proteína microbiana las diferencias perdieron relevancia estadística (P<0.068). Cuando la excreción láctea se utilizó en lugar de la urinaria como un índice estimador, se apreció un cambio significativo en la respuesta, la excreción de DP en leche incremento con el tratamiento experimental reflejando mayoritariamente las variaciones registradas en la producción de leche

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CICYT 95-0498. El Dr. González-Ronquillo fue financiado por el Instituto de Cooperación Iberoamericana y la Universidad Autónoma del Estado de México.

REFERENCIAS

ARC., 1984. The nutrient requirement of Ruminant Livestock. Suppl. 1. CAB., Commonwealth Agricultural Bureaux, England.

Balcells, J., Parker D.S., Seal C.J., 1992. Comp. Biochem. Physiol. 101B: 633-636.

Faichney, G.J. 1975.. Pages, 277-291 In: Digestion and Metabolism in Ruminant. Eds. I.W. McDonald and A.C.I. Warner. University of New England Publishing Unit, Armidale

González-Ronquillo, M., Balcells, J.,. Guada J.A y Vicente, F. 2003. J. Dairy Sci. 86. In press.

Giesecke, D.J.,. Ehrentreich, L and M. Staingassinger. 1994.. J. Dairy. Sci. 77: 2376-2381.

Martín-Orúe, S.M., Balcells, J., Zakraoui, F., Castrillo, C., 1998. Anim. Feed. Sci. Tech. 71, 269-282.