EFECTO DEL PH Y LA TASA DE DILUCIÓN SOBRE EL PERFIL Y EL FLUJO DE AMINOÁCIDOS DE ORIGEN BACTERIANO EN UN SISTEMA DE CULTIVO CONTINUO

M. Rodríguez, S. Calsamiglia, A. Ferret
Dept. de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España

INTRODUCCIÓN

Los actuales sistemas de racionamiento para el vacuno lechero (p.e. INRA, NRC, 2001; Sistema Cornell) incorporan estimaciones de las necesidades y aportes de aminoácidos (AA) al intestino delgado en sus modelos de predicción. Una proporción importante de los AA que fluyen al intestino delgado son de origen microbiano (50-80%; Storm y Ørskov, 1983). Aunque la población microbiana adherida a la fracción sólida (BS) constituye aproximadamente un 80% de la población microbiana total del rumen (Craig et al., 1987), la mayoría de los estudios realizados utilizan la población microbiana asociada a la fracción líquida (BL) como referencia, ya que se asume que no existen diferencias importantes entre poblaciones microbianas. Sin embargo, varios autores (Martin et al, 1996; Yang et al., 2001) han observado diferencias importantes en la composición química y el perfil de AA entre BL y BS.

Es probable que ciertas condiciones de fermentación como el pH y la tasa de dilución afecten a la contribución parcial de BL y BS al flujo total de materia microbiana al intestino delgado y, por lo tanto, su contribución estimada al aporte de AA al intestino delgado del rumiante. La hipótesis es que si el pH y la tasa de dilución afectan a la contribución parcial de BL y BS, y su perfil de aminoácidos es distinto, el flujo de AA de origen microbiano será distinto. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del pH y la tasa de dilución (TD) sobre el perfil y flujo de AA de origen microbiano en un sistema de cultivo continuo de flujo doble.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 fermentadores continuos de flujo doble (Calsamiglia *et al.* 2002), inoculados con líquido ruminal extraído de dos vacas provistas de cánula ruminal. El experimento se realizó en dos periodos consecutivos de 10 días cada uno (7 de adaptación y 3 de muestreo). El diseño experimental fue en bloques al azar (periodo), con arreglo factorial de tratamientos, siendo el pH (Alto: 6.5 y Bajo: 5.5) y la tasa de dilución de sólidos (TD; Lenta: TDL=4%/h y Rápida: TDR=10%/h), los factores principales. Los tratamientos fueron la combinación de los factores principales. La temperatura (39ºC), la tasa de dilución de líquidos (10 %/h) y la ingestión de MS (80 g MS/d) se mantuvieron constantes. La dieta (60:40 forraje concentrado, 17% PB, 23.9% FND) se suministró de manera semi-continua (0.556 g/10 min) utilizando un alimentador de pistones. Durante los días de muestreo, los efluentes permanecieron a 4ºC, de donde se tomaron muestras para determinar su contenido en MS, cenizas, N total y bases púricas. Los pellet bacterianos se obtuvieron del contenido total del fermentador. Las BL se obtuvieron por filtración y centrifugación diferencial, mientras que las BS se obtuvieron del residuo sólido, tras la aplicación de varios métodos de desligamiento (Whitehouse *et al.*, 1994) y del mismo proceso de filtración y centrifugación diferencial que las BL. En ambos grupos bacterianos se determinó el contenido en MS, MO, N, bases púricas y perfil de AA. El flujo de AA de origen bacteriano se calculó a partir del contenido en AA de las bacterias (gAA/gMS) y el flujo de MS bacteriana (g/d), siendo éste último estimado a partir del contenido en bases púricas en cada grupo bacteriano y en el efluente. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM del SAS (1988), y la comparación de medias se realizó mediante el método de mínimos cuadrados (LSMEANS). La comparación del perfil y flujo de AA entre BL y BS se realizó mediante un test pareado (t-test).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron interacciones entre pH y TD en el perfil y flujo de AA. En consecuencia, los resultados se presentan según los efectos principales (Tabla 1). El

perfil de AA de las bacterias difirió sólo en 3 (Thr, Arg y His) de los 9 AA esenciales (AAE; $P < 0.05$) cuando el pH se redujo de 6.5 a 5.5, aunque la magnitud de las diferencias fue numéricamente poco importante. Cuando se estudió el efecto de TD, el perfil de AAE de las bacterias difirió ($P < 0.05$) en 6 (Arg, Val, Ile, Leu, Lys e His) de los 9 EAA cuando TD se redujo de 10 a 4%/h. Aunque dichas diferencias fueron dependientes del tipo de población microbiana considerada, el contenido en Ile fué un 28% mayor en TDR comparado con TDL, tanto con BL como con BS.

Tabla 1. Efectos del pH y la tasa de dilución sobre el perfil y flujo de AA.

AA	GB[a]	Perfil AA (g/100 g AA)				EE	Flujo AA (g/d)				EE
		pH		TD			pH		TD		
		5.5	6.5	TDL	TDR		5.5	6.5	TDL	TDR	
Thr	BL	5.7^{e}	6.2^{d}	5.9	6.0	0.06	0.57	0.61	0.70^{f}	0.48^{g}	0.08
	BS	5.7^{e}	6.1^{d}	5.9	5.9	0.05	0.58	0.62	0.69	0.51	0.08
Arg	BL	3.6^{d}	3.3^{e}	3.4	3.6	0.06	0.56	0.58	0.70^{d}	0.44^{e}	0.07
	BS	3.7^{d}	3.3^{e}	3.4^{e}	3.6^{d}	0.04	0.59	0.57	0.69^{f}	0.47^{g}	0.07
Val	BL	4.9	5.2	5.1	5.0	0.13	0.70	0.75	0.89^{d}	0.56^{e}	0.10
	BS	5.0	5.2	4.8^{d}	5.3^{e}	0.10	0.73	0.75	0.88^{f}	0.60^{g}	0.10
Met	BL	1.3	1.3	1.2	1.4	0.07	0.27	0.28	0.36^{d}	0.19^{e}	0.05
	BS	1.3	1.2	1.2	1.3	0.07	0.28	0.29	0.36^{d}	0.20^{e}	0.04
Ile	BL	3.9	4.2	3.7^{e}	4.5^{d}	0.22	0.66	0.69	0.86^{d}	0.50^{e}	0.09
	BS	3.9	4.2	3.4^{e}	4.7^{d}	0.18	0.67	0.69	0.85^{d}	0.52^{e}	0.09
Leu	BL	5.9	5.8	5.9	5.9	0.13	0.79	0.84	1.00^{d}	0.62^{e}	0.11
	BS	6.1	5.9	5.8^{e}	6.3^{d}	0.09	0.84	0.83	0.99^{f}	0.68^{g}	0.11
Phe	BL	3.3	3.4	3.3	3.3	0.05	0.45	0.49	0.57^{d}	0.36^{e}	0.06
	BS	3.4	3.4	3.4	3.5	0.04	0.49	0.48	0.56	0.40	0.06
Lys	BL	11.4	11.1	11.4	11.1	0.26	0.93	0.95	1.16^{d}	0.72^{e}	0.14
	BS	11.2	10.7	10.6^{g}	11.2^{f}	0.20	0.94	0.95	1.15^{d}	0.73^{e}	0.14
His	BL	3.1^{d}	2.6^{e}	2.9	2.9	0.06	0.18	0.19	0.23^{d}	0.14^{e}	0.03
	BS	3.2^{d}	2.7^{e}	3.1^{d}	2.9^{e}	0.07	0.20	0.18	0.22^{f}	0.15^{g}	0.03
AAE[b]	BL	43.1	42.9	42.7	43.3	0.63	5.11	5.38	6.47^{d}	4.02^{e}	0.72
	BS	43.4	42.8	41.6^{e}	44.6^{d}	0.41	5.31	5.35	6.40^{f}	4.26^{g}	0.73
AANE[c]	BL	56.8	57.1	57.2	56.7	0.63	4.71	4.89	5.64^{f}	3.95^{g}	0.61
	BS	56.6	57.2	58.3^{d}	55.4^{e}	0.41	4.84	4.96	5.64	4.16	0.66
Total	BL	-	-	-	-	-	9.82	10.27	12.11^{d}	7.98^{e}	1.33
	BS	-	-	-	-	-	10.15	10.32	12.04^{f}	8.43^{g}	1.38

[a] GB = Grupo bacteriano, considerando BL ó BS en el cálculo.
[b] AAE Incluye Thr,Arg,Val,Met,Ile,Leu, Phe, Lys, His. [c] AANE Incluye Ia,Asp,Glu,Gly,Pro,Ser,Tyr.
[d, e] Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).
[f, g] Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.10$).

Cuando se evaluó el efecto de los factores principales sobre el flujo total de AAE de origen bacteriano, se observaron diferencias en el flujo cuando se varió la TD pero no cuando se varió el pH (Tabla 1). Al variar la TD de 10 a 4%/h, se observaron diferencias en el flujo de todos los AAE de origen bacteriano, aunque al igual que en caso del perfil, las diferencias ó el nivel de significación fue, en la mayoría de los casos, dependiente del grupo bacteriano utilizado en los cálculos. En general, el flujo de AA bacterianos totales, AAE ($P < 0.05$) y AANE ($P < 0.10$) fue mayor en TDL comparado con TDR cuando BL se utilizó en los cálculos. Cuando se utilizó BS, sólo el flujo de AA totales y esenciales tendió ($P < 0.10$) a ser mayor en TDL comparado con TDR. Las diferencias en el perfil (g/100g AA) de AA fueron biológicamente poco importantes, y contrastan con las diferencias cuantitativamente importantes en el flujo de AA (g/d). Esta aparente contradicción indica que la

estimación del flujo de materia seca microbiana (dependiente de la relación N.purinas) tiene un impacto mayor en la estimación del flujo de AA de origen bacteriano que las diferencias en el perfil de AA.

Los resultados de la comparación del perfil y flujo de AA esenciales entre BL y BS se presentan en la Tabla 2. Al comparar el perfil de AA entre ambas poblaciones se observó que la concentración de Phe e His fue mayor ($P < 0.05$) y la de Thr tendió a ser menor ($P < 0.10$) en BS comparado con BL. En este caso, tanto la magnitud de la diferencia como el número de AA que difirieron entre BL y BS fue menor a la observada por Martin et al. (1996) y Yang et al. (2001). Al comparar el flujo de AAE (g/d) no se observaron diferencias al utilizar BL o BS en el cálculo.

Tabla 2. Diferencias en el perfil y flujo de AA entre BL y BS en cultivo continuo

AA	Perfil AA[a] (g/100 g AA)			Flujo AA[a] (g/d)		
	BL	BS	EE	BL	BS	EE
Thr	5.99[f]	5.90[g]	0.04	0.59	0.60	0.01
Arg	3.48	3.51	0.02	0.57	0.58	0.01
Val	5.06	5.07	0.12	0.73	0.74	0.01
Met	1.30	1.26	0.06	0.28	0.28	0.01
Ile	4.08	4.02	0.11	0.68	0.68	0.01
Leu	5.87	6.01	0.11	0.81	0.84	0.02
Phe	3.32[e]	3.43[d]	0.04	0.47	0.48	0.01
Lis	11.24	10.94	0.21	0.94	0.94	0.01
His	2.87[e]	2.97[d]	0.04	0.19	0.19	0.01
AAE[b]	43.04	43.14	0.49	5.25	5.33	0.09
AANE[c]	56.96	56.86	0.49	4.80	4.90	0.07
Total	-	-	-	10.05	10.24	0.16

[a] GB = Grupo bacteriano, considerando BL ó BS en el cálculo.
[b] Incluye Thr; Arg; Val; Met; Ile; Leu; Phe; Lys; His.
[c] Incluye Ala; Asp; Glu; Gly; Pro; Ser; Tyr.
[d, e] Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).
[f, g] Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.10$).

CONCLUSIONES

El perfil de AAE de las poblaciones BL y BS, y el flujo estimado a partir de la composición de BL y BS fue muy similar. Sin embargo, tanto el pH como la TD afectaron al perfil de AAE de las bacterias BL y BS, así como al flujo de AAE de origen bacteriano. Las diferencias fueron mayores en la estimación del flujo (g/d) que en el perfil (g/100g AA), lo que indica que la estimación del flujo de materia microbiana (dependiente de la relación N:purinas) tiene un impacto importante en la estimación del flujo de AA de origen microbiano. El flujo estimado de AAE de origen bacteriano fue mayor en TDL comparado con TDR, aunque la magnitud del incremento varió en función de la población microbiana utilizada. La estimación precisa del flujo de AA de origen bacteriano al intestino delgado debe considerar las condiciones de fermentación ruminal, y la composición química y contribución parcial de los grupos bacterianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Calsamiglia, S., A. Ferret, M. Devant. 2002. J. Dairy Sci. 85:574.
Craig, W, G. Broderick, D. Bradford. 1987. J. Nutrition 117:56.
Martin, C., L. Bernard, B. Michalet-Doreau.1996. J. Anim. Sci. 74:1157.
Statistical Analysis System. 1988. SAS user's guide. SAS Institute, Cary, NC.
Storm, E., E. R. Ørskov. 1983. Br. J. Nut. 50:479.
Whitehouse, N. L., V. M. Olson, C. G. Schwab, W. R. Chesbro, K. D. Cunningham, T. Lycos. 1994. J. Anim. Sci. 72:1335.
Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, L. M. Rode. 2001. J. Anim. Sci. 79:2736.

Financiado por el proyecto CICYT AGF97-0444