

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**Departament de Ciència Animal i dels Aliments**

**Tesis Doctoral**

**Factores que Afectan a la Fermentación Microbiana, y al Perfil y  
Flujo de Aminoácidos de las Bacterias Asociadas con las  
Fracciones Líquida y Sólida en un Sistema de Cultivo Continuo**

María Rodríguez Prado  
Junio 2003

**FACTORES QUE AFECTAN A LA FERMENTACIÓN MICROBIANA, Y AL  
PERFIL Y FLUJO DE AMINOÁCIDOS DE LAS BACTERIAS ASOCIADAS  
CON LAS FRACCIONES LÍQUIDA Y SÓLIDA EN UN SISTEMA DE CULTIVO  
CONTINUO**

Tesis doctoral presentada por:

María Rodríguez Prado

Bajo la dirección de:

Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort

Para optar al grado de Doctor en el Programa de Producción Animal de la

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

Bellaterra, Junio de 2003

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

**CERTIFICA:** Que la memoria intitulada “**Factores que afectan la fermentación, el perfil y flujo de aminoácidos microbianos en un sistema de cultivo continuo**” presentada por la Ing. Agr. **María Rodríguez Prado** se realizó bajo su dirección y, considerando que cumple con las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en el Programa de Producción Animal que otorga la *Universitat Autònoma de Barcelona*, autoriza su disertación pública para que sea juzgada por la comisión correspondiente

y, para que así conste, firma la presente en Bellaterra, a los 11 días del mes de Abril de 2003.

**Dr. Sergio Calsamiglia Blancafort**

La realización de los estudios del tercer ciclo que culminan con la presentación de la presente tesis doctoral ha sido posible gracias al apoyo de las siguientes instituciones:

- **Universidad del Zulia** (Maracaibo, Venezuela), por el otorgamiento de una Beca-Sueldo para realizar los estudios de Doctorado en la Universitat Autònoma de Barcelona.
- **Universitat Autònoma de Barcelona** (Barcelona, España), por darme la oportunidad de realizar los estudios de Tercer Ciclo.
- La Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología del Gobierno Español (**Proyecto CICYT AGF 97-0444**), por el aporte financiero para la ejecución del segundo y tercer proyecto de la fase experimental.
- **NANTA-NUTRECO**, por el aporte financiero parcial para la ejecución del primer proyecto de la fase experimental.

*A la memoria de mis padres: Pedro y  
Dita, fuerza moral y espiritual...*

*A ti Diego mi pequeño por siempre:  
razón de ser y deseos de superación...*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han contribuido directa o indirectamente para que este proyecto llegue a feliz término:

A Sergio, quien más que un director ha sido un amigo, por permitirme formar parte de tu equipo. Gracias por tu apoyo, confianza, y sobre todo por tu paciencia.

A la Universidad del Zulia de cuya familia formo parte, por su apoyo financiero y respaldo hacia mi persona para lograr mi crecimiento profesional.

A Ferret, quien junto a Sergio soportaron a esta mortal durante el tiempo que duró mi experiencia con los fermentadores, gracias también por tu apoyo.

A todo el personal que labora en la Unitat de Producció Animal y la Unitat d'Agricultura: M<sup>a</sup> José, Casals, Xavi, Dolors, Elena, Maite, Josefina, Jordi, Rosa, Blas, y a ti Gerardo, no te preocupes no me olvido de las cabras y las ovejas. De igual forma quisiera expresar mi agradecimiento a todo el personal de la Unitat de Nutrició, Tecnología dels Aliments y Farmacología (En especial a Carles y Beto) por la colaboración prestada, así como a Quico de la Unitat de Biología Mol.lecular, por permitir la determinación de los AA, pilar fundamental de esta tesis. También quiero hacer extensivo el agradecimiento al personal de la granja, aunque en esta etapa de mi formación no porté mucho por allí, no crean que me olvidé de ustedes, mi estancia por allí dejó sus huellas...

A mis compañeros: Cristina, David, Elizabeth, Patra, Devant, Jaume, Raul, Imed, Maristela, Silvia-s, Ester-es, Paul, Lorena, Roger, Daniel, Vikki, Moez, Ahmed-es, M<sup>a</sup> José, Jordi, ... y, una mención especial póstuma a mi amigo Douglas, por todo gracias...

De igual forma quiero agradecer doblemente a todos aquellos con los que pase largas horas en presencia y cuidando a nuestros hijos putativos, los fermentadores y sus alrededores: Paul, Devant, Sara, Silvia, Carla, Begoña, Sergio, Alfret, Lorena, y si hay algún otro y lo obvié, por favor discúlpenme..., siempre he sido pésima para los nombres.

A mis amigos y compañeros: Alirio y su tropa, Daniel y su combo, Armando y Westalia, Atilio, Xomaira e hijos, William, Denice y familia, Zuly, Jesús y familia y en fin, a todos aquellos con quien compartimos momentos inolvidables, gracias una vez más... Asimismo, a todos mis amigos y compañeros venezolanos, para quienes no tengo palabras de agradecimiento por su apoyo, confianza y apuesta al futuro.

A toda mi familia y, en especial, a mi hijo, a mis hermanos, cuñados y sobrinos, gracias por su paciencia, apoyo, confianza e impulso para continuar por este sendero...

En fin, quiero hacer extensivo el agradecimiento a todo aquel que de una u otra forma haya contribuido con el alcance de este logro, por pequeño que haya sido tu aporte, ya sea tangible o no, de verdad mil gracias....

## RESUMEN GENERAL

Los sistemas modernos de formulación de raciones para el vacuno lechero se basan en los conceptos de proteína digestible y aporte de AA al intestino delgado del rumiante. De la cantidad total de proteína sintetizada en el rumen y que llega al intestino delgado del rumiante, una proporción importante, aunque variable, corresponde a la proteína microbiana, la cual proviene, fundamentalmente, de las bacterias. Aunque la mayor parte de las bacterias están adheridas a las partículas sólidas (BS), en la mayoría de los estudios realizados con el fin de evaluar los aportes de proteína microbiana se utilizan muestras de bacterias obtenidas de la fracción líquida del contenido ruminal (BL). Existe suficiente evidencia que indica que la composición química y el perfil de AA difieren entre BL y BS. Esas diferencias pueden estar relacionadas con importantes errores en la predicción del flujo de proteína y AA de origen microbiano. Por otro lado, es probable que factores relacionados con la dieta (relación forraje:concentrado, nivel de fibra, tamaño de partículas del forraje, nivel de ingestión, ...) por sus efectos en el patrón de fermentación y metabolismo proteico, puedan afectar a la contribución parcial de BL y BS, y con ello a los aportes de proteína o AA de origen microbiano. De igual forma, la contribución parcial de BL y BS también puede ser alterada como consecuencia de los cambios que se producen en el entorno ruminal debido a variaciones en la dieta o en las pautas de alimentación (pH, tasa de dilución, ...). El estudio de cada uno de dichos factores *in vivo* es difícil, ya que la complejidad de la fermentación ruminal puede confundir la interpretación de los resultados. En este contexto, el uso de los sistemas *in vitro* de cultivo continuo (fermentadores) ofrecen la oportunidad de estudiar cada uno de los factores de forma aislada, manteniendo el resto de factores constantes. Por lo tanto, los principales objetivos del presente trabajo fueron evaluar el efecto de variaciones en la dieta (nivel de fibra y tamaño de partículas del forraje) y en las condiciones de fermentación (pH y tasa de dilución de sólidos) en la fermentación ruminal, el flujo de nutrientes, y el perfil y flujo de AA de origen microbiano utilizando la

composición de BL y BS en los cálculos en un sistema de cultivo continuo de flujo doble.

Los principales objetivos del primer experimento fueron: 1) Poner a punto la técnica de fermentadores para dar inicio a una nueva línea de investigación para estudiar la fermentación microbiana ruminal y el flujo post-ruminal de nutrientes. 2) Evaluar la posibilidad de obtener muestras de bacterias aisladas de las fracciones líquida y sólida en cantidad suficiente para permitir realizar las determinaciones analíticas correspondientes. 3) Se evaluó además, el efecto de la inclusión del aditivo **Regepro**<sup>®</sup> en la fermentación microbiana y el flujo post-ruminal de nutrientes utilizando muestras de BL y BS. Para ello se utilizaron ocho fermentadores continuos de flujo doble en tres periodos consecutivos de 8 días (5 de adaptación y 3 de muestreo). Los tratamientos fueron la dosis del aditivo **Regepro**<sup>®</sup> (**0; 0.15; 0.30 y 0.45 g/kg MS**) y del tipo de dieta (**CS** = dieta a base de silo de maíz y **RS** = dieta a base de silo de raygrass). El diseño experimental fue en bloques al azar con arreglo factorial (2 x 4) de tratamientos. Las condiciones de temperatura (39°C), pH (6.4), tasa de dilución de líquidos (10%/h) y sólidos (5%/h), e ingestión (100 g MS/d) se mantuvieron constantes. El último día de muestreo, el contenido del fermentador se utilizó para aislar BL y BS, cuya composición se utilizó para estimar el flujo de N de origen microbiano. Los resultados observados permiten concluir que ambos objetivos se cumplieron, ya que por un lado, se puso a punto el equipo de fermentación como método de estudio y, por el otro, la cantidad de muestra de ambas fracciones microbianas fue suficiente (superior a 1 g por fermentador y tratamiento) para permitir la realización de los análisis correspondientes. Los datos obtenidos confirman las diferencias en la composición química entre BL y BS, aunque sólo se correspondieron en diferencias significativas en la estimación de la digestibilidad real de la MS. Por último, la inclusión de **Regepro**<sup>®</sup> a dosis moderadas (0.15 – 0.30 g de **Regepro**<sup>®</sup>/100 g MS dieta), resultó en la reducción en la concentración de N amoniacal (-18%,  $P < 0.10$ ) sin afectar a otros parámetros de la fermentación ruminal, lo cual se considera un efecto positivo para su uso potencial en el vacuno lechero con el propósito de disminuir la concentración de amoníaco en el rumen cuando se utilizan dietas con alto contenido proteico.



En el segundo experimento se estudiaron de forma aislada los efectos del nivel de fibra en la dieta (NF: **FA** = 67:33 y **FB** = 39:61 heno de alfalfa:concentrado, respectivamente) y el tamaño de partículas del forraje (TP: **PG** =  $\geq 3$  mm; **PP** =  $\leq 1$  mm) en la fermentación microbiana y el flujo post-ruminal de nutrientes, utilizando muestras de BL y BS. Para ello se utilizaron 8 fermentadores continuos de flujo doble en dos periodos consecutivos de 10 días cada uno (7 de adaptación y 3 de muestreo). El diseño experimental fue en bloques al azar con arreglo factorial (2 x 2) de tratamientos, que fueron la combinación del los 2 niveles de fibra y tamaño de partículas. Las condiciones de temperatura (39°C), pH (6.4), tasa de dilución de líquidos (10%/h) y sólidos (5%/h), e ingestión (95 g MS/d) se mantuvieron constantes. El último día de muestreo se aislaron bacterias BL y BS de cada fermentador, cuya composición se utilizó para estimar la digestibilidad real de la MO, la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM), y el flujo de N y de AA de origen microbiano. No se observaron efectos del NF o TP en la digestibilidad real de la MS, MO o de la fibra. La producción total de AGV fue mayor ( $P < 0.05$ ) en FB (122 mM) comparado con FA (102 mM). La proporción de acetato fue mayor en FA (63.5%) comparado con FB (58.2%). Cuando se utilizó la PP en vez de la PG, se observó una reducción ( $P < 0.05$ ) en la proporción de acetato (63.4 vs 58.3%, respectivamente), y en la relación acetato:propionato (3.13 vs 2.41, respectivamente). No se observaron efectos de NF o TP en la concentración de N amoniacal, ni en los flujos de N (total, amoniacal, no amoniacal o alimentario) o en la degradación de la proteína, excepto para el flujo de N de origen microbiano, el cual fue mayor, y el flujo de N de origen alimentario que fue menor en PP comparado con PG, aunque sólo cuando BL se utilizó en los cálculos. La ESPM se vio afectada por TP cuando BL se utilizó en los cálculos y por NF cuando BS se utilizó en los cálculos. El perfil de AA difirió entre BL y BS ( $P < 0.05$ ) en 4 de los 16 AA estudiados. El NF y TP afectaron poco al perfil y al flujo de AA de origen microbiano. Sin embargo, el flujo de AA de origen microbiano fue mayor en 13 de los 16 AA evaluados, cuando BS en vez de BL se utilizaron en los cálculos. Los efectos del NF y TP sobre la fermentación microbiana, y el perfil y el flujo AA fueron independientes de la dieta, el pH, la ingestión o las

tasas de dilución. La estimación del flujo de N bacteriano, la ESPM, y el perfil y el flujo de AA de origen microbiano fueron dependientes del tipo de población microbiana utilizada en los cálculos, por lo que la representatividad de la muestra microbiana es esencial para una estimación precisa del flujo de AA de origen microbiano.

En el tercer experimento también se utilizaron los 8 fermentadores indicados anteriormente, pero en este caso los factores evaluados fueron 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**) en la fermentación microbiana y el flujo post-ruminal de nutrientes, utilizando muestras de BL y BS. La fase experimental consistió igualmente de 2 periodos de 10 días cada uno (7 de adaptación y 3 de muestreo), utilizando el mismo diseño experimental (bloques al azar con arreglo factorial de tratamientos), que fueron la combinación de los dos factores principales. En este caso las condiciones que se mantuvieron constantes fueron la temperatura (39°C), la tasa de dilución de líquidos (10%/h) y el nivel de ingestión (80 g MS/d). De igual forma, el último día de muestreo se aislaron BL y BS de cada fermentador, cuya composición se utilizó para estimar la digestibilidad real, la ESPM, y el flujo de N y AA de origen microbiano. La digestibilidad real de la MS y MO fueron menores a pH bajo, pero sólo cuando BS se utilizó en los cálculos. La digestión de la fibra disminuyó a pH bajo y TDR. La producción total y el perfil de AGV fueron afectados más por el pH que por la TD. A pH 5,5, la concentración y el flujo de N amoniacal ( $P < 0.05$ ), y la degradación de proteína ( $P < 0.10$ ) fueron menores y el flujo de N alimentario fue mayor ( $P < 0.10$ ) cuando se comparó con el pH 6.5. La ESPM tendió a ser mayor a pH bajo ( $P < 0.10$ ), pero sólo cuando BS se utilizó en los cálculos. La TDR se caracterizó por un mayor flujo de N de origen microbiano, degradación de la proteína y ESPM, y un menor flujo de N de origen alimentario comparado con TDL. Sin embargo, los resultados de flujo de N de origen alimentario y degradación proteica fueron dependientes de la población bacteriana utilizada en los cálculos. Para estimar la contribución de los AA microbianos al flujo total de AA utilizando BL o BS, el contenido de AA de cada aislado bacteriano fue multiplicado por el flujo de MS bacteriana estimada para cada fracción. El pH

afectó el perfil ( $P < 0.05$ ) pero no al flujo estimado de AA de origen microbiano. La TD afectó ( $P < 0.05$ ) al perfil y al flujo estimado de AA de origen microbiano. La variación en la TD (de 10 a 4%/h) resultó en diferencias en el flujo estimado de AA microbianos en 11 de los 16 AA medidos, aunque el número de AA y la magnitud de la diferencia fueron dependientes de la población microbiana utilizada en los cálculos. Sin embargo, al comparar el perfil o el flujo de AA entre BL y BS, sólo se observaron diferencias en el contenido (gAA/100 gAA) de Phe, His y Tyr. Los resultados demuestran que tanto el pH como la TD afectaron el patrón de fermentación microbiana, pero los resultados fueron dependientes de la población microbiana utilizada como referencia en los cálculos. El contenido de AA en BL y BS puede variar según las condiciones de fermentación. Sin embargo, la variación en la estimación de la síntesis de proteína microbiana observados con los cambios en la TD tuvieron un mayor impacto en el flujo estimado de AA microbianos que las diferencias observadas en el perfil de AA de las bacterias.

## ABSTRACT

Current feeding system for dairy cattle protein nutrition define requirements and dietary supplies of N on the bases of metabolizable protein and AA. An important but variable proportion of total protein flowing to the small intestine is microbial protein, which is mainly of bacterial origin. Although the largest proportion of the rumen microbial bacteria is attached to feed particles (SAB), most research to evaluate supplies of microbial protein has been conducted using the bacterial population associated with the liquid fraction (LAB). There is considerable evidence that the chemical composition and the AA profile of LAB and SAB differ. These differences may be responsible for errors in the prediction of the flow of bacterial protein and AA. It is likely that dietary factors (forage to concentrate ratio, fiber content, forage particle size, intake,...) will affect the partial contribution of each bacterial fraction and their estimated contribution to the supply of protein or AA from microbial origin to the small intestine. Similarly, the partial contribution of each bacterial fraction may be altered as a consequence of the changes produced in ruminal conditions (pH and dilution rate) when diet or feeding conditions are modified. The isolation of these main factors *in vivo* is difficult, because ruminal complexity may confound the results. In this context, the use of *in vitro* continuous culture system (fermenters) offers the opportunity to study each factor independently, while maintaining constant other factors. The main objectives of this study were to evaluate the effect of changes in the diet type (fiber level and particle size) and in the fermentation conditions (pH and dilution rates) on fermentation profile, nutrient flows and the profile and flow of AA from bacterial origin using LAB or SAB composition data in a dual-flow continuous culture system.

The main objectives of the first experiment were: 1) To set up of the dual-flow continuous culture system as a method to study the microbial fermentation and post-ruminal nutrient flow. 2) To evaluate the possibility to obtain sufficient samples of LAB and SAB for chemical analysis. 3) To study the effect of the inclusion of **Regepro**<sup>®</sup> (RP) on microbial fermentation and nutrient flows using LAB and SAB isolates. Eight dual-flow continuous culture fermenters (1,320 mL)

were used in three consecutive periods (5 for adaptation and 3 for sampling). Treatments were diet type (**CS** = Corn silage; **RS** = Ryegrass silage based diets) and RP dose (**0; 0.15; 0.30, and 0.45 g/kg DM**). Data was analyzed as a completely randomized block with a 2 x 4 factorial arrangement of treatments. Temperature (39°C), pH (6.4), liquid (10%/h) and solid (5%/h) dilution rates, and intake (100 g DM/d) were maintained constant. The LAB and SAB were obtained the last day of sampling, and composition data was used to estimate microbial N flow. The fermentation system was successfully installed and enough sample of SAB and SAB was obtained to conduct all required analysis. Results confirmed the differences in chemical composition between LAB and SAB, but only the estimated true DM digestibility was affected by the bacterial isolate used for calculations. The inclusion of RP at intermediate doses (0.15 – 0.30 g RP/100 g DM diet) reduced ammonia N concentration (18%,  $P < 0.10$ ), with no other effects on microbial fermentation profile, which is considered a positive effect. This finding indicate that the additive RP may be included in dairy cattle diets to reduce ammonia N concentration when higher protein diets are fed.

The second experiment consisted in the evaluation of the effect of fiber content in the diet (FC: HF = 67:33 and LF = 39:61 alfalfa hay:concentrate, respectively) and particle size of forage (PS: LS =  $\geq 3$  mm; SS =  $\leq 1$  mm) on microbial fermentation, nutrient, and AA flow of microbial origin, using LAB and SAB compositional data. Eight dual-flow continuous culture fermenters were used in two consecutive periods of 10 days each (7 for adaptation and 3 for sampling). Data was analyzed as a completely randomized block with a 2 x 2 factorial arrangement of treatments. Temperature (39°C), pH (6.4), liquid (10%/h) and solid (5%/h) dilution rates, and intake (95 g DM/d) were maintained constant. The LAB and SAB were obtained the last day of sampling, and composition data was used to estimate true OM digestibility, efficiency of microbial protein synthesis (EMPS), and microbial N and AA flow. There were no effects of fiber content or particle size on true OM or fiber digestibilities. Total VFA production was higher ( $P < 0.05$ ) in HF (122 mM) compared with LF (102 mM). The proportion of acetate was higher for HF (63.5%) compared with LF (58.2%). When SS was fed instead of LS, there was a reduction ( $P < 0.05$ ) in the acetate

proportion (63.4 vs 58.3, respectively), and in the acetate to propionate ratio (3.13 vs 2.41, respectively). There were no effect of FC or PS on ammonia-N concentration, and on total, ammonia, non-ammonia and dietary N flows, or on protein degradation, except for bacterial N flow that was higher, and dietary N flow that was lower in SS compared to LS when LAB were used for calculations. The EMPS was affected by PS when LAB were used for calculations, and by FC when SAB were used. The AA profile of LAB differed from SAB ( $P < 0.05$ ) in four out of 16 AA. The FC and PS had small effects on microbial AA profile and flows. However, the bacterial AA flow was higher in 13 of out 16 AA, when SAB instead of LAB were used for calculations. The effects of FC or PS on fermentation pattern and AA profile and flows were independent of diet, pH, intake and dilution rates. Estimates of bacterial N flow, EMPS, and AA profile and flows of microbial origin were dependents on the type of microbial population used for calculations. The representativeness of the microbial samples is essential for the accurate prediction of the AA flow from microbial origin.

The third experiment was designed to study the effects of pH and solid dilution rates on microbial fermentation and nutrients flows using LAB and SAB composition data. Eight dual-flow continuous culture fermenters were used in two consecutive 10-d periods (7-d for adaptation and 3-d for sampling). Temperature (39 °C), intake (80 g DM/d) and liquid dilution rate (10%/h) were maintained constant. Treatments were arranged in a 2 x 2 factorial, being pH (High: **6.5**; low: **5.5**) and solid dilution rate (Slow: **4%/h = SSDR**; or Fast: **10%/h = FSDR**) the main factors. The LAB and SAB isolates were obtained the last day of sampling for chemical analysis, and composition data was used to estimate true OM digestibility, efficiency of microbial protein synthesis (EMPS), and microbial N and AA flow. True digestibility of DM and OM were lower at low pH, but only when SAB were used for calculations. Fiber digestion was also lower at low pH and FSDR. The VFA production and profile were affected more by pH than DR. At pH 5.5, the ammonia N concentration and flow ( $P < 0.05$ ), and protein degradation ( $P < 0.10$ ) were lower, and that of dietary N flow higher ( $P < 0.10$ ) compared with pH 6.5. The EMPS tended ( $P < 0.10$ ) to be higher at low pH, only when SAB were used for calculations. The FSDR was characterized by a higher bacterial N

flow, protein degradation and EMPS, and a lower dietary N flow compared with SSTR. However, results of dietary N flow and protein degradation were different depending on the bacterial population selected for calculations. To estimate the contribution of microbial AA to the total AA flow using LAB or SAB, the AA content of each bacterial isolate was multiplied by the bacterial DM flow estimated within each isolate. Solid dilution rate and pH affected ( $P < 0.05$ ) the AA profile of LAB and SAB. The pH did not affect the estimated flow of bacterial AA. The change of solid dilution rate (10 to 4%/h) resulted in differences in the estimated flow of microbial AA in 11 out of the 16 AA measured. The number of AA that changed were dependent of the microbial population data used. When the average across all treatments of the AA content (gAA/100 gAA) or flow (g/d) of SAB vs LAB were compared, no significant differences were detected, except for the content of Phe, His, and Tyr. Results demonstrate that dilution rate and pH affected microbial fermentation profile. However, results were different depending on the microbial population selected for calculations. The AA content of SAB and LAB may be different and affected by ruminal fermentation conditions. However, variation in the estimation of microbial protein synthesis observed with changes in solid dilution rate has a greater impact than differences in the AA profile in the estimated microbial AA flow.

**INDICE GENERAL**

	Pág.
<b>CAPÍTULO 1. Revisión Bibliográfica</b>	
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Fermentación microbiana de los nutrientes en el rumen</b> .....	5
2.1. Degradación de los carbohidratos en el rumen .....	5
2.2. Degradación de los compuestos nitrogenados en el rumen .....	7
<b>3. Síntesis de proteína microbiana en el rumen y su eficiencia</b> .....	9
3.1. Síntesis de proteína microbiana .....	9
3.2. Estimación de la síntesis de proteína microbiana .....	10
3.2.1. Aislamiento microbiano .....	12
3.2.2. Identificación de la proteína microbiana mediante el uso de la técnica de marcadores .....	13
3.3. Predicción de la síntesis de proteína microbiana en los distintos sistemas de formulación .....	14
3.4. Eficiencia de síntesis de proteína microbiana (EMPS) .....	19
3.5. Factores que afectan la síntesis de proteína microbiana y su eficiencia .....	22
3.5.1. Factores relacionados con el aporte de nutrientes en la dieta ..	23
3.5.1.1. Aporte de energía .....	23
3.5.1.2. Aporte de nitrógeno .....	28
3.5.1.3. Sincronización del aporte de energía y proteína .....	33
3.5.1.4. Otros factores relacionados con la dieta o con la disponibilidad de nutrientes para la síntesis de proteína microbiana .....	38
3.5.2. Factores relacionados con cambios físicos en el medio ruminal	41
3.5.2.1. Efectos del pH ruminal .....	41
3.5.2.2. Efecto de la tasa de dilución .....	46
<b>4. Composición de la proteína microbiana</b> .....	50
4.1. Importancia de la proteína microbiana para el rumiante .....	50
4.2. Composición química de la proteína microbiana .....	51



	Pág.
4.2.1. Factores de variación de la composición química de la proteína microbiana .....	52
4.2.1.1. Diferencias relacionadas con las técnicas utilizadas en el aislamiento microbiano .....	53
4.2.1.2. Diferencias relacionadas con el tipo de población microbiana utilizada .....	55
4.2.1.3. Otros factores que afectan la composición química de la proteína microbiana .....	60
4.3. Composición química de la proteína microbiana y sus efectos sobre el flujo de AA de origen microbiano .....	63
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>65</b>
<b>6. Objetivos .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>67</b>

## **CAPÍTULO 2. Experimento 1:**

Efecto del tipo de dieta y la dosis de REGEPRO® sobre la fermentación microbiana y el flujo de nutrientes en un sistema de cultivo continuo

<b>Effect of type of diet and the REGEPRO® dose on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system ..</b>	<b>91</b>
Abstract .....	91
Introduction .....	92
Materials and Methods .....	93
Results and Discussion .....	97
Implications .....	107
Literatura Cited .....	107

**CAPÍTULO 3. Experimento 2:**

Efectos del nivel de fibra y el tamaño de partículas sobre la fermentación microbiana y el flujo de aminoácidos de origen microbiano en un sistema de cultivo continuo

**Effects of fiber content and particle size on microbial fermentation and amino acid flow from microbial origin in a continuous culture system**

<b>system</b> .....	113
Abstract .....	113
Introduction .....	114
Materials and Methods .....	115
Results and Discussion .....	119
Implications .....	134
Literatura Cited .....	134

**CAPÍTULO 4. Experimento 3:**

Efecto del pH y la tasa de dilución sobre el perfil y flujo de aminoácidos de origen microbiano en un sistema de cultivo continuo

**The role of pH and dilution rate on the profile and flow of amino acids of microbial origin in a continuous culture system**

<b>system</b> .....	141
Abstract .....	141
Introduction .....	142
Materials and Methods .....	143
Results and Discussion .....	147
Implications .....	163
Literatura Cited .....	164

**CAPÍTULO 5. Análisis y Discusión General de Resultados**

1. El sistema de cultivo continuo de flujo doble.....	171
2. Coeficientes de digestibilidad .....	176
3. Fermentación ruminal .....	179
Ácidos grasos volátiles .....	179

	Pág.
Metabolismo del nitrógeno .....	184
4. Perfil y Flujo de aminoácidos de origen microbiano .....	193
5. Referencias Bibliográficas .....	198
<b>Capítulo 6. Conclusiones</b> .....	<b>207</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### CAPÍTULO 1. Revisión Bibliográfica

#### Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales marcadores microbianos utilizados para estimar la síntesis de proteína microbiana en el rumen .....	15
<b>Tabla 2.</b> Estimación de la síntesis de proteína microbiana y su eficiencia en los distintos sistemas de formulación de raciones para el vacuno lechero .....	17
<b>Tabla 3.</b> Eficiencia de síntesis de proteína microbiana .....	21
<b>Tabla 4.</b> Comparación del perfil de aminoácidos de bacterias ruminales, músculo y leche .....	51
<b>Tabla 5.</b> Composición química de las bacterias ruminales .....	52
<b>Tabla 6.</b> Perfil de aminoácidos de las bacterias ruminales .....	53
<b>Tabla 7.</b> Composición química de las distintas poblaciones microbianas del rumen .....	56
<b>Tabla 8.</b> Perfil de AA (% del total de AA) en bacterias asociadas a las fracciones líquida y sólida de la digesta .....	61

#### Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Rutas metabólicas de los carbohidratos en el rumen .....	6
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del metabolismo del N en el rumen	8
<b>Figura 3.</b> Esquema general de las rutas de degradación de proteína a amoníaco y enzimas asociadas .....	9
<b>Figura 4.</b> Efecto del pH sobre la digestión de NDF y nitrógeno microbiano producido por kg de alimento suministrado a los fermentadores ..	51

	Pág.
<b>Figura 5a.</b> Efecto de la tasa de dilución de líquidos sobre la síntesis y la EMPS .....	47
<b>Figura 5b.</b> Efecto de la tasa de dilución de sólidos sobre la síntesis y la EMPS .....	48
<b>Figura 5c.</b> Efecto de los cambios en el flujo de sólidos y líquidos sobre la síntesis y EMPS en cultivo continuo .....	49

## **CAPÍTULO 2. Experimento 1**

### **Índice de Tablas**

<b>Table 1.</b> Ingredients and chemical composition of the diets .....	94
<b>Table 2.</b> Effect of diet type and <b>Regepro</b> <sup>®</sup> dose on apparent and true DM, OM, NDF and ADF digestion in continuous culture .....	99
<b>Table 3.</b> Effect of diet type and <b>Regepro</b> <sup>®</sup> dose on volatile fatty acid production and profile by mixed ruminal bacteria in continuous culture .....	101
<b>Table 4.</b> Effect of diet type and <b>Regepro</b> <sup>®</sup> dose on nitrogen metabolism of ruminal microorganisms in continuous culture .....	105
<b>Table 5.</b> Differences between solid and liquid associated bacteria in continuous culture .....	106

### **Índice de Figuras**

<b>Figure 1.</b> Effect of type of diet and <b>Regepro</b> <sup>®</sup> dose on acetate to propionate ratio in continuous culture .....	102
<b>Figure 2.</b> Effect of diet type and <b>Regepro</b> <sup>®</sup> dose on ammonia-N concentration in continuous culture .....	104

## **CAPÍTULO 3. Experimento 2**

### **Índice de Tablas**

<b>Table 1.</b> Ingredients and chemical composition of the diets .....	116
---	-----

	Pág
<b>Table 2.</b> Effect of fiber content and particle size of the diets on apparent and true DM, OM, NDF and ADF digestion in continuous culture .....	121
<b>Table 3.</b> Effect of fiber content and particle size of the diets on volatile fatty acid production and profile by mixed ruminal bacteria in continuous culture .....	122
<b>Table 4.</b> Effect of fiber content and particle size of the diets on nitrogen metabolism of ruminal bacteria population in continuous culture .....	124
<b>Table 5.</b> Differences between solid and liquid associated bacteria in continuous culture .....	124
<b>Table 6.</b> Effect of fiber content and particle size of the diets on effluents amino acid flow (g/d) in continuous culture .....	126
<b>Table 7.</b> Effect of fiber content and particle size of the diets on amino acid profile (g AA/100 g AA) of liquid and solid associated bacteria in continuous culture .....	130
<b>Table 8.</b> Differences in amino acid flow (g/d) of microbial origin between solid and liquid associated bacteria in continuous culture .....	131
<b>Table 9.</b> Effect of fiber content and particle size of the diets on the estimated flow of amino acids (g/d) of liquid and solid associated bacteria in continuous culture .....	133

## **CAPÍTULO 4. Experimento 3**

### **Índice de Tablas**

<b>Table 1.</b> Effect of pH and dilution rate on apparent and true DM, OM, NDF and ADF digestion in continuous culture.....	148
<b>Table 2.</b> Effect of pH and dilution rate on volatile fatty acid production and profile by mixed ruminal bacteria in continuous culture.....	150
<b>Table 3.</b> Effect of pH and dilution rate on nitrogen metabolism of ruminal bacteria population in continuous culture.....	151
<b>Table 4.</b> Differences between solid and liquid associated bacteria in continuous culture.....	155

	Pág.
<b>Table 5.</b> Effect of pH and dilution rate on effluents amino acid flow (g/d) in continuous culture .....	157
<b>Table 6.</b> Effect of pH and dilution rate on amino acid profile (g/100g AA) of liquid and solid associated bacteria in continuous culture .....	159
<b>Table 7.</b> Differences in amino acid flow (g/d) of microbial origin between solid and liquid associated bacteria in continuous culture.....	161
<b>Table 8.</b> Effect of pH and dilution rate on the amino acid flow (g/d) of liquid and solid associated bacteria in continuous culture .....	162

## **CAPÍTULO 5. Análisis y Discusión General de Resultados**

### **Índice de Tablas**

<b>Tabla 1.</b> Relación entre algunas variables y la estimación de la síntesis de proteína microbiana (g/d) utilizando BL y BS como referencia .....	192
<b>Tabla 2.</b> Perfil de aminoácidos esenciales (% del total de AA) en bacterias asociadas a las fracciones líquida y sólida de la digesta. Datos bibliográficos y experimentales .....	195
<b>Tabla 3.</b> Resumen comparativo del efecto de los factores principales en el perfil y flujo de aminoácidos esenciales de las bacterias .....	197

### **Índice de Figuras**

<b>Figura 1.</b> Procedimiento utilizado para el aislamiento de las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida del contenido del fermentador .....	175
<b>Figura 2.</b> Efecto del pH y del tipo de dieta en la proporción molar de los principales ácidos grasos volátiles .....	183
<b>Figura 3.</b> Efecto del pH y del tipo de dieta en la relación acetato: propionato .....	183
<b>Figura 4.</b> Relación entre la concentración de nitrógeno amoniacal y la síntesis de proteína microbiana .....	188
<b>Figura 5.</b> Relación entre la cantidad de MORD y la síntesis de proteína microbiana .....	189

	Pág.
<b>Figura 6.</b> Relación entre la cantidad de proteína bruta degradada y la síntesis de proteína microbiana .....	190
<b>Figura 7.</b> Relación entre la cantidad de FND digerida y la síntesis de proteína microbiana .....	191

CAPÍTULO 1  
**Revisión Bibliográfica**



## 1. Introducción

El nivel de producción del vacuno lechero en Europa Occidental y en Norteamérica ha aumentado espectacularmente en los últimos 20 años, con rebaños cuyas producciones medias anuales superan los 12.000 Kg por animal (Tamminga y Hof, 2000; USDA, 2001). Este aumento se ha debido fundamentalmente a las mejoras en genética, reproducción, manejo y alimentación. Los conocimientos científicos en el área de la nutrición animal han permitido el desarrollo de guías y normas de formulación (INRA, 1988; Russell *et al.*, 1992; AFRC, 1993; NRC, 2001), y la aplicación de los avances del conocimiento a las condiciones reales de producción.

Los primeros sistemas modernos de formulación utilizaron el concepto de proteína bruta (PB) digestible (NRC, 1978) para determinar las necesidades y aportes de proteína en rumiantes. Sin embargo, este concepto no permitía describir los procesos metabólicos de la proteína en el rumen, ni predecir la cantidad y naturaleza de la proteína disponible en el intestino delgado para su absorción y utilización metabólica (Tamminga y Hof, 2000). La principal limitación de la proteína bruta como criterio de formulación es que ignora las numerosas transformaciones que la proteína sufre durante la fermentación ruminal.

El primer avance importante en la incorporación de conceptos de fisiología ruminal en los sistemas de formulación proteica fue la introducción de los conceptos de proteína degradable y no degradable en rumen (INRA, 1988; AFRC, 1993; NRC, 1985, 1989). Este esquema contempla las distintas vías de utilización de la proteína ingerida en la dieta, y hace una separación entre las necesidades de proteína degradable de los microorganismos, y las necesidades totales del animal (Chase, 1996; Tamminga y Hof, 2000). La definición y observación de estas fracciones son particularmente importantes en la formulación de raciones para el vacuno lechero de alta producción (Schingoethe, 1996), ya que permite mejorar la precisión en las predicciones de las necesidades y los aportes de la proteína en el vacuno lechero.

A pesar de las mejoras derivadas de la incorporación de estos conceptos en la formulación de raciones, estos sistemas tenían aún limitaciones. Entre ellas, la utilización de un valor fijo de digestibilidad intestinal para la proteína no degradada en rumen, la utilización de un valor constante para la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (NRC, 1989; INRA, 1988, Russell *et al.*, 1992), el ignorar la contribución de la proteína endógena al flujo intestinal, y la falta de definición de las necesidades y aportes de aminoácidos (AA) al intestino delgado, entre otras (NRC, 1989; INRA, 1988).

Los sistemas de formulación de raciones más recientes para el vacuno lechero se basan en los conceptos de proteína digestible en el intestino (INRA, 1988) y de aporte de aminoácidos al intestino delgado del rumiante (O'Connor *et al.*, 1993; Rulquin and Verité, 1993; NRC, 2001). Los rumiantes, al igual que los monogástricos, necesitan AA absorbibles, y no proteína *per se*, para la síntesis de tejidos y proteínas de la leche (Schwab, 1996; NRC, 2001). Este hecho se considera un paso adelante en el refinamiento de la formulación de raciones para el vacuno lechero de alta producción.

Más recientemente, el interés en mejorar la precisión en la formulación proteica en los rumiantes ha dependido no sólo de la necesidad de seguir mejorando la producción y reduciendo costes, sino que se ha visto presionado por reducir el impacto medio ambiental del uso excesivo de nitrógeno en las dietas (Berentsen *et al.*, 1992; Rulquin y Verité, 1993; Tamminga, 1996). La mejora en la precisión en la formulación de raciones pasa, probablemente, por el desarrollo de modelos mecanísticos y dinámicos de la fermentación ruminal. Oldham (1996) enumeró diez elementos básicos necesarios para describir el metabolismo proteico en el rumen y predecir los aportes proteicos de una ración, y que son utilizados en diferentes grados de complejidad por los actuales sistemas de formulación proteica en el vacuno lechero:

- Proteína bruta degradada en rumen
- Ritmo de degradación y paso de la digesta
- Producción de proteína microbiana en función de la energía
- Proporción de la proteína verdadera en la proteína bruta microbiana

- Cantidad de nitrógeno no proteico (NNP) que se recicla al rumen
- Coeficiente de absorción real en el intestino delgado de la proteína microbiana verdadera
- Coeficiente de absorción real en el intestino delgado de la proteína alimentaria no degradada en rumen
- Pérdidas de N endógeno
- Eficiencia de conversión de la proteína absorbida en proteína animal
- Necesidades proteicas para los procesos de mantenimiento, crecimiento, gestación y producción.

Aunque los sistemas de formulación proteica comparten los principios básicos, presentan diferencias numéricas con respecto a la caracterización de los alimentos y las necesidades del animal. El valor asignado a cada uno de los parámetros arriba señalados, y que son utilizados para valorar el metabolismo ruminal de la proteína, difiere entre los distintos sistemas.

Las diferencias observadas en los valores de ritmo de paso de la digesta y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana utilizados en los distintos sistemas de racionamiento del vacuno lechero constituyen un ejemplo de esta variación. En el sistema de formulación utilizado en los países escandinavos se asigna un valor de 0.08 para el ritmo de paso; en el sistema holandés se toma en cuenta el tipo de dieta utilizada, y el valor difiere entre forrajes y concentrados (0.045 para forrajes y 0.06 para concentrados) (Tamminga y Hof, 2000). En el sistema Cornell (Cornell Net Carbohydrate and Protein System, CNCPS), el ritmo de paso puede ser cambiado a juicio del usuario según el tipo y características del ingrediente utilizado y el nivel de ingestión (Russell *et al.*, 1992). En el NRC (2001) el ritmo de paso de la digesta también difiere según el tipo de dieta, y para su estimación se utilizan distintas ecuaciones: forrajes verdes =  $3.054 + 0.614(\text{DMI, \% peso vivo})$ ; forrajes secos =  $3.362 + 0.479(\text{DMI, \% peso vivo}) - 0.007(\% \text{ concentrado en la dieta}) - 0.017(\% \text{ FND})$ ; y concentrados =  $2.904 + 1.375(\text{DMI, \% peso vivo}) - 0.020(\% \text{ concentrado en la dieta})$ . Existen diferencias similares en cuanto al valor de eficiencia de síntesis de proteína microbiana: 150 g/kg materia orgánica fermentada en el rumen

(MOFR; países escandinavos, Tamminga y Hof, 2000); 23.2 g N/kg MOFR (INRA, 1988); 20.8 g N/kg nutrientes digeribles totales corregido (NRC, 2001). En el CNCPS (Russell *et al.*, 1992), la eficiencia de síntesis de proteína microbiana no se considera constante, sino que ésta depende de distintos factores como: las necesidades de mantenimiento de los microbios, la velocidad de crecimiento, la disponibilidad de energía y proteína, etc.

En todos los sistemas, los aportes de proteína o AA al intestino delgado del rumiante corresponden a la sumatoria de la proteína microbiana sintetizada en el rumen, la proteína endógena y la proteína alimentaria no degradada en el rumen (Cecava *et al.*, 1990b; Clark *et al.*, 1992; Cozzi *et al.*, 1995). La complejidad de los factores que afectan al flujo de cada una de estas fracciones hace difícil predecir la cantidad y el perfil de los AA (nutrientes que finalmente serán absorbidos por el animal) que fluyen al intestino delgado del rumiante (Kung y Rode, 1996), ya que a diferencia del monogástrico, la composición en AA de la proteína disponible para el animal depende de la naturaleza de la proteína que sale del rumen, y no de la que es ingerida por el animal (Hvelplund y Madsen, 1985).

De la cantidad total de proteína que sale del rumen, una proporción importante, aunque variable ( $55.1 \pm 16.7\%$ ), corresponde a la proteína de origen microbiano (Archimede *et al.*, 1997), la cual representa entre el 55 y el 87% del total del N aminoacídico (Clark *et al.*, 1992), e indica la relevancia de esta fracción para el vacuno lechero. Sin embargo, la estimación de la contribución al flujo total de proteína que llega al intestino delgado, así como la determinación del perfil de AA y los factores que lo afectan, continúa siendo un factor limitante de los sistemas actuales de formulación. La importancia de la mejora en la precisión de dichas predicciones justifica el desarrollo de numerosos trabajos experimentales en esta área (Mabjeesh *et al.*, 1997; Firkins *et al.*, 1998; Timmermans *et al.*, 2000; Bateman *et al.*, 2001a, b).

La mejora en la predicción del flujo de AA de origen microbiano requiere la predicción del flujo de proteína microbiana total, su perfil de AA, y los factores alimentarios o del entorno que los afectan. El objetivo de esta revisión es

actualizar los conocimientos de los factores que afectan al perfil y flujo de aminoácidos de origen microbiano al intestino delgado de los rumiantes.

## **2. Fermentación microbiana de los nutrientes en el rumen.**

El proceso de fermentación anaeróbica en el rumen convierte los substratos (principalmente carbohidratos y proteínas) en proteína microbiana y otros productos finales de la fermentación (ácidos grasos volátiles, CO<sub>2</sub>, péptidos, AA, ...), los cuales son metabolizados por el rumiante. Se consideró conveniente iniciar esta revisión bibliográfica con una visión general del proceso de fermentación microbiana de los carbohidratos y las proteínas en el rumen, debido a la importancia de estos nutrientes para la síntesis de proteína microbiana en el rumiante. Este aspecto constituye un paso previo al estudio de la síntesis de proteína microbiana, los factores que la afectan y sus efectos sobre el flujo de AA al intestino delgado del rumiante.

### **2.1. Degradación de los carbohidratos en el rumen.**

El grado y velocidad de degradación de los carbohidratos en el rumen varía según el tipo y estructura de los mismos (McAllister *et al.*, 1990, 1993, 1994; Varga y Kolver, 1997, Figura 1), y según la población microbiana predominante (Hespell y Bryant, 1979; Sniffen *et al.*, 1983). El tipo de carbohidrato aportado en la dieta condiciona la proliferación y actividad fermentativa de un conjunto de microorganismos determinado (Sniffen *et al.*, 1983). Si la dieta ofrecida contiene mayor proporción de carbohidratos estructurales (dieta forrajera), proliferan las bacterias celulolíticas, las cuales degradan principalmente celulosa, hemicelulosa y pectina (Van Soest *et al.*, 1994; Weimer *et al.*, 1999). Las condiciones que prevalecen en un rumen alimentado con una dieta forrajera, como son un mayor tiempo de retención de las partículas en el rumen, y el pH ruminal cercano a la neutralidad, propician su crecimiento y replicación (McAllister *et al.*, 1994; Weimer, 1996).

La actividad degradativa de las bacterias celulolíticas se inicia con la adhesión a la superficie de la pared celular, provocando la ruptura y subsecuente degradación de substratos celulósicos (Kudo *et al.*, 1987; Theodorou y France, 1993; McAllister *et al.*, 1994; Weimer, 1996). Este factor se considera uno de los principales condicionantes de la digestión de la fibra (Mackie y White, 1990; Weimer, 1996). La actividad degradativa de las bacterias celulolíticas difiere según la familia botánica del forraje (leguminosas vs gramíneas), el estado fisiológico, el grado de madurez de la planta, la forma física, el procesado y la presencia de factores anti-nutritivos (Galyean y Goetsch, 1993).

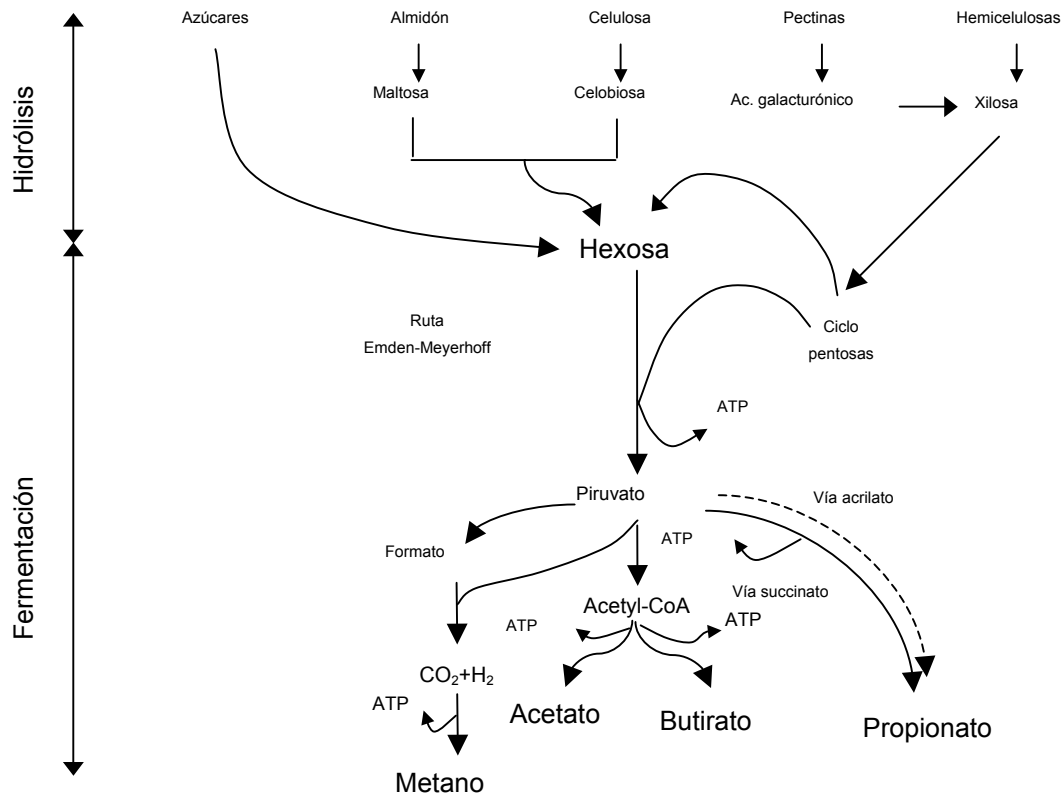


Figura 1. Rutas metabólicas de los carbohidratos en el rumen (Fuente: France y Siddons, 1993, Jouany *et al.*, 1995).

Por el contrario, si la dieta suministrada al animal incluye grandes cantidades de carbohidratos no estructurales (azúcares, almidones o

carbohidratos rápidamente degradables), proliferan los microorganismos con elevada actividad amilolítica (Theodorou y France, 1993). Los granos de cereales constituyen la principal fuente de carbohidratos no estructurales. No obstante, existen diferencias importantes en el patrón de degradación microbiana ruminal según el tipo de cereal y su ritmo de degradación (por ejemplo, maíz vs cebada), o el método de procesado al cual es sometido (Nocek y Tamminga, 1991; Nozière y Michalet-Doreau, 1997; Archimede *et al.*, 1997).

La adhesión y colonización de las partículas del gránulo constituye, al igual que en el caso de bacterias celulolíticas, el primer paso de la digestión de almidones por parte de las bacterias amilolíticas (McAllister *et al.*, 1990, 1993). Este grupo de bacterias se caracterizan por poseer una velocidad de crecimiento rápida, gran afinidad por los substratos y tolerancia a niveles de pH ruminal inferiores a 6.0 (Russell, 1991).

Cuando los carbohidratos (estructurales y no estructurales) se exponen al ataque microbiano experimentan, en primer lugar, una fase de hidrólisis que los degrada hasta hexosas y pentosas (Figura 1). Posteriormente, sigue una fase fermentativa (vía piruvato) hasta la formación de los ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente acetato, propionato y butirato. Dichos ácidos se producen por la acción de enzimas bacterianos (principalmente extracelulares) y protozoarios (principalmente intracelulares, Russell y Strobel, 1993). Los AGV son los principales productos finales de la fermentación de carbohidratos en el rumen, así como también la principal fuente de energía utilizada por los rumiantes, y su concentración y proporciones son consecuencia de la composición del substrato y la población microbiana que los degrada (Nocek y Tamminga, 1991; Beever, 1993; France y Siddons, 1993; Van Houtert, 1993).

## **2.2. Degradación de los compuestos nitrogenados en el rumen.**

La degradación de la proteína en el rumen se presenta de forma esquemática en las Figuras 2 y 3. Las proteínas, bien de origen alimentario o endógeno, se degradan por la acción microbiana a componentes simples:

péptidos, AA y amoníaco (Wallace y Cotta, 1988; Mackie y White, 1990; Broderick *et al.*, 1991; Wallace, 1996). Los AA y los péptidos pueden ser utilizados directamente por los microorganismos ruminales, o se desaminan para producir cadenas carbonadas y amoníaco (Maeng y Baldwin, 1976). El N amoniacal constituye la fuente principal de N para los microorganismos ruminales, el cual puede suplir entre el 40 y el 100% de las necesidades de N para la síntesis de proteína microbiana (Stern y Hoover, 1979).

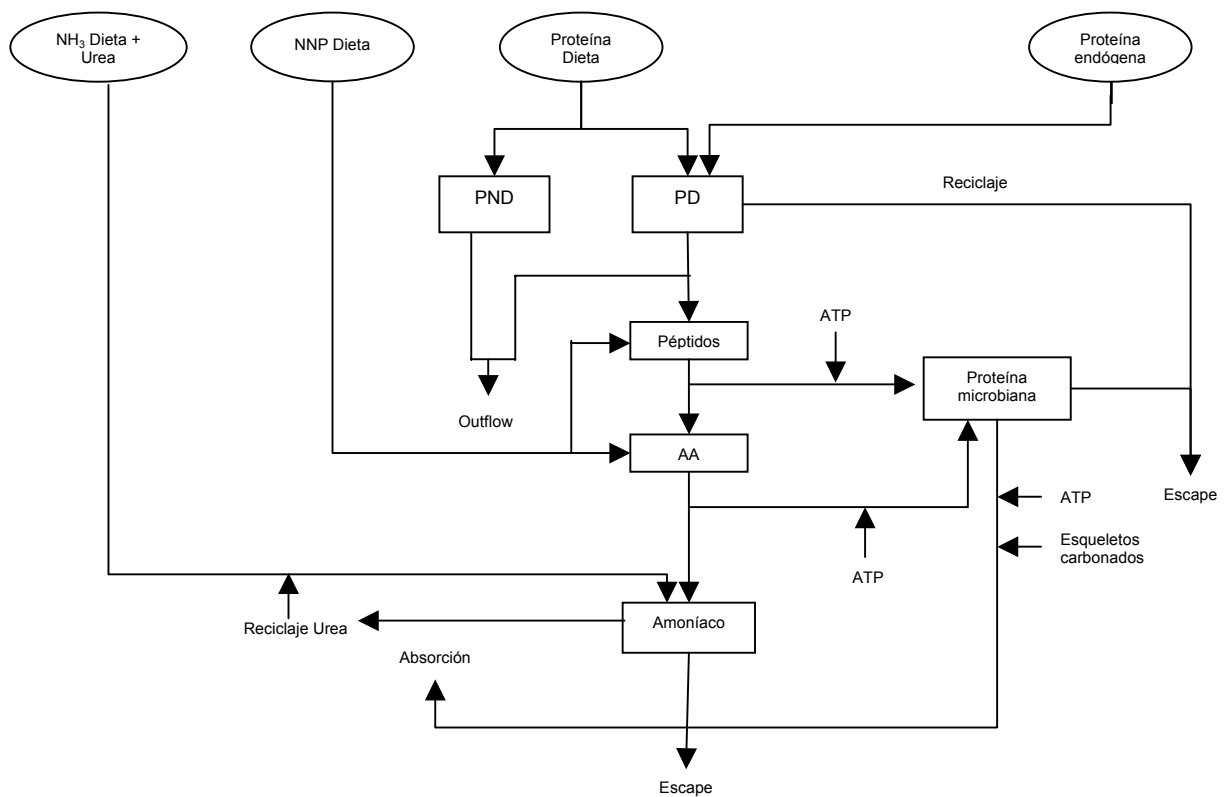


Figura 2. Representación esquemática del metabolismo del N en el rumen (Fuente: Beaver, 1993).

El ritmo de degradación de la proteína en el rumen está afectado por las características intrínsecas de la proteína (solubilidad, estructura, y degradabilidad), y por la actividad proteolítica de los microorganismos ruminales (Leng y Nolan, 1984; Satter, 1986; Hino y Russell, 1987; Wallace, 1996). La actividad proteolítica está regulada, a su vez, por factores relacionados con la



dieta, el régimen de alimentación, la relación forraje:concentrado, la forma de presentación de la ración, el método de procesado, etc. (Satter, 1986; Wallace y Cotta, 1988; Broderick *et al.*, 1991; Stern *et al.*, 1994). Estos factores pueden provocar cambios en el pH, en la velocidad de tránsito ruminal y en la población microbiana predominante, que a su vez pueden alterar la actividad proteolítica (Satter, 1986; Wallace, 1996; Schadt *et al.*, 1999). De igual forma, estos factores afectan a la calidad de la proteína alimentaria no degradada en el rumen y que fluye al intestino delgado del rumiante (Stern *et al.*, 1994).

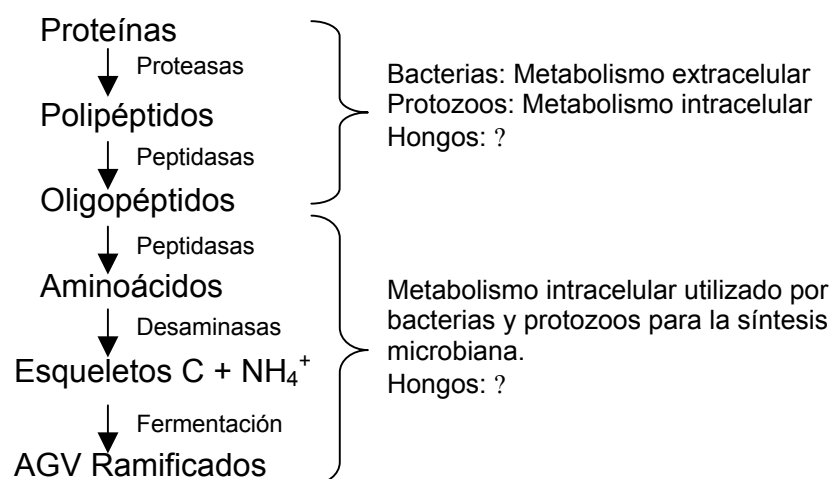


Figura 3. Esquema general de las rutas de degradación de proteína a amoníaco y enzimas asociadas (Modificado de Mackie y White, 1990; Jouany *et al.*, 1995).

### 3. Síntesis de proteína microbiana en el rumen y su eficiencia.

#### 3.1. Síntesis de proteína microbiana

La síntesis de proteína microbiana se puede definir como la cantidad de proteína de origen microbiano producida en el rumen (síntesis neta), y se expresa en gramos de N o de proteína (N x 6.25) por día (Van Soest, 1994; Broudiscou y Jouany, 1995). Sin embargo, en la práctica suele medirse como la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen que fluye al intestino delgado del rumiante (flujo de proteína microbiana). La síntesis diaria de proteína microbiana no es equivalente al flujo diario, ya que una parte importante de la

proteína microbiana sintetizada en el rumen no llega al intestino delgado, sino que se recicla dentro del rumen en proporciones variables, como consecuencia de la actividad predatoria de los protozoos y, en menor grado, a la acción de bacteriófagos y micoplasmas (Firkins, 1996). El reciclaje del N afecta a la cantidad y a la eficiencia neta de la conversión de los substratos en proteína microbiana, dado que la proteína microbiana degradada está sujeta a la desaminación, requiriéndose energía para su resíntesis (Dijkstra *et al.*, 1998). Nolan y Leng (1972) indicaron que entre un 30 y 50% de la proteína microbiana podía reciclarse en el rumen. Por su parte, Firkins (1996) indicó que éste rango puede ser mucho mayor (entre un 20 y 90% del total de de proteína microbiana sintetizada) dependiendo del tipo de dieta aportada.

Las bacterias, los protozoos y los hongos utilizan los nutrientes aportados en la dieta para sintetizar proteína *de novo* en el rumen (NRC, 2001). La mayor parte de la proteína microbiana sintetizada en el rumen y que llega al intestino delgado (aproximadamente un 80%), es de origen bacteriano (Nolan, 1993). Los protozoos, aunque en determinados regímenes de alimentación pueden constituir más de un 40% de la masa microbiana ruminal (Veira, 1986), contribuyen escasamente (10%) al flujo microbiano total, ya que éstos son retenidos selectivamente en el rumen, especialmente cuando se suministran dietas con altos niveles de fibra (Weller y Pilgrim, 1974; Hino y Russell, 1987). La cantidad de proteína sintetizada por los hongos es aún menor. Además, existe poca información disponible sobre su aporte al flujo total de proteína (Orpin, 1983/84), el cual se estima inferior al 5% (Nolan, 1993).

### **3.2. Estimación de la síntesis de proteína microbiana.**

Para estimar la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen y que fluye al intestino delgado del rumiante se recurre normalmente al uso de marcadores. Para ello se requiere medir o estimar dos componentes: la cantidad total de marcador microbiano que sale del rumen y/o que fluye al intestino delgado (flujo total) y la concentración de ese marcador en la masa microbiana (Brodiscou y Jouany, 1995).

La medición del flujo total de marcador difiere según el tipo de experimento utilizado. En los experimentos realizados *in vivo*, el procedimiento consiste en medir o estimar el flujo total del marcador microbiano al abomaso o duodeno. Para ello se requiere el uso de animales provistos con cánulas en esos tramos del tracto digestivo (Faichney, 1993; Titgemeyer, 1997; Tamminga y Chen, 2000). La medición del flujo puede realizarse de forma directa o indirecta. La medición directa consiste en la colección total de la digesta utilizando cánulas re-entrantes (Beever *et al.*, 1974; Oldham y Ling, 1977), aunque su implantación provoca alteraciones a nivel intestinal que limitan la obtención de muestras representativas (Faichney, 1993; Tamminga y Chen, 2000; Dewhurst *et al.*, 2000). La medición indirecta consiste en utilizar cánulas simples (Tipo “T”), en cuyo caso se toman muestras puntuales representativas del flujo duodenal y se estima el flujo total mediante el uso de una o dos sustancias indigestibles marcadoras de flujo. Entre los diversos métodos indirectos, el de doble marcado es el más adecuado, y consiste en el uso de dos sustancias marcadoras en forma conjunta, una para marcar la fase líquida y otra para la fase sólida (Firkins *et al.*, 1998).

Los experimentos *in vitro* y, más específicamente, los sistemas de cultivo continuo, permiten medir el flujo mediante la colección total del efluente, a la vez que se controla el ritmo de paso de las fracciones líquida y sólida, por lo que no se requiere el uso de marcadores de flujo (Stern *et al.*, 1978). Dado que la presente tesis doctoral se basó en el uso de un sistema de cultivo continuo de flujo doble, no se profundizará sobre el uso de marcadores para la medición del flujo duodenal.

El otro componente necesario para estimar la síntesis de proteína microbiana consiste en diferenciar la proteína microbiana sintetizada del resto de compuestos nitrogenados que fluyen al intestino delgado (Cecava *et al.*, 1990b; Clark *et al.*, 1992; Broudiscou y Jouany, 1995). El procedimiento comúnmente utilizado consiste en:

- i) Aislar los microbios presentes en el rumen.

- ii) Identificar la proteína microbiana en el flujo total de proteína, mediante el análisis de una sustancia química específica (marcador), que se supone caracteriza a los componentes microbianos presentes (Stern y Hoover, 1979).
- iii) Realizar el cálculo mediante el establecimiento de una relación N: marcador microbiano en la digesta y en la muestra de microbios (Broderick y Merchen 1992; Broudiscou y Jouany, 1995; Titgemeyer, 1997).

La cuantificación de la síntesis de proteína microbiana constituye uno de los aspectos más limitantes en el estudio de la alimentación proteica de los rumiantes (Broderick y Merchen, 1992; Firkins *et al.*, 1998). Sin embargo, su medición y/o predicción resulta extremadamente variable (NRC, 2001). Dicha variación se relaciona en gran medida con las técnicas de aislamiento microbiano, y la discriminación de la proteína microbiana frente a la no microbiana.

### **3.2.1. Aislamiento microbiano.**

La obtención de una muestra representativa de los microorganismos que habitan en el rumen constituye un aspecto fundamental para lograr una adecuada estimación de la síntesis de proteína microbiana. Sin embargo, el aislamiento microbiano a partir de la digesta ruminal o duodenal constituye uno de los aspectos más difíciles de la investigación del metabolismo nitrogenado ruminal (Stern *et al.*, 1994). Existen dificultades relacionadas con las propias técnicas de muestreo y de aislamiento, así como también con el tipo de población microbiana utilizada y su composición.

En la mayoría de los casos, las muestras microbianas utilizadas para estimar la síntesis y/o eficiencia de síntesis de proteína microbiana contienen sólo bacterias de la fracción líquida (Broderick y Merchen, 1992; Titgemeyer *et al.*, 1997), aún cuando debería ser representativa de la población de bacterias y protozoos asociados con las fracciones líquida y sólida de la digesta (Marais,

2000). Sin embargo, los protozoos son retenidos de forma selectiva en el rumen, y representan una pequeña proporción del flujo microbiano total (Weller y Pilgrim, 1974), por lo que el error cometido con dicha contribución es menos importante. Además, este aspecto es menos relevante en los sistemas de cultivo continuo *in vitro*, ya que la población de protozoos es reducida (Stern *et al.*, 1978).

El uso de distintos métodos de aislamiento o el uso de muestras no representativas de toda la población microbiana, se relaciona con diferencias en la composición química, lo cual afecta la estimación de la síntesis de proteína microbiana. Este aspecto se presenta con mayor detalle en el apartado 4.2.1 de esta revisión bibliográfica.

### **3.2.2. Identificación de la proteína microbiana mediante el uso de la técnica de marcadores.**

La identificación de la proteína microbiana se basa en el uso de sustancias marcadoras específicas de los microorganismos ruminales. Estas sustancias pueden ser constituyentes propios de los microorganismos (marcadores microbianos internos) o bien sustancias químicas que se incorporan experimentalmente en los cuerpos microbianos (marcadores externos). El ácido diaminopimélico (DAPA), el ácido aminoetil-fosfónico (AEP), la D-alanina, y los ácidos nucleicos (ADN, ARN, bases púricas) son ejemplos de marcadores internos, mientras que los isótopos ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ) son ejemplos de marcadores externos (Stern y Hoover, 1979; Broderick y Merchen, 1992).

Para que una sustancia se considere un marcador microbiano ideal debe reunir una serie de requisitos, que pueden ser resumidos de la siguiente forma (Stern y Hoover, 1979; Broderick y Merchen, 1992; Faichney, 1993):

- i) Su análisis debe ser fácil, rápido y preciso;
- ii) Su distribución en la población microbiana presente debe ser homogénea, constante y estable;

iii) No debe estar presente en el alimento.

En la actualidad se considera que no existe un marcador microbiano ideal simple (Marais, 2000). Cada uno de los marcadores microbianos posee una serie de inconvenientes, incluyendo la seguridad, el coste, la dificultad de análisis, la presencia en los alimentos o la falta de especificidad con la fracción microbiana marcada (Tabla 1). Todos estos aspectos pueden conducir a errores en la estimación de la síntesis de proteína microbiana (Titgemeyer, 1997; Dewhurst *et al.*, 2000; Marais, 2000).

Los marcadores microbianos más utilizados para la diferenciación de la proteína microbiana han sido el DAPA y el contenido en bases púricas como marcadores internos, y el  $^{15}\text{N}$  como marcador externo (Broderick y Merchen, 1992; Illg y Stern, 1994; Stern *et al.*, 1994).

Broderick y Merchen (1992), después de un análisis extenso de los distintos marcadores microbianos, recomendaron el uso de purinas o  $^{15}\text{N}$  y, en la medida de lo posible, ambos. Estos autores señalaron que el uso de las bases púricas es adecuado por ser un procedimiento sencillo que permite cuantificar la síntesis de proteína microbiana bajo condiciones prácticas de alimentación. El uso de  $^{15}\text{N}$  infundido de forma continua (intra-ruminalmente) o discontinua (dosificada en el alimento) se considera un método más preciso y adecuado, pero su coste puede limitar su uso en condiciones prácticas.

### **3.3. Predicción de la síntesis de proteína microbiana en los distintos sistemas de formulación.**

Como se señaló anteriormente, la predicción de cuánta proteína de origen microbiano llega al intestino delgado del rumiante constituye uno de los aspectos relevantes tomados en consideración por los actuales sistemas de racionamiento proteico para el vacuno lechero. Cada uno de los distintos sistemas de formulación utiliza ecuaciones de predicción, que se obtienen a partir de datos experimentales. En la Tabla 2 se presenta, de forma resumida, algunas de las ecuaciones utilizadas por los principales sistemas de racionamiento.

Tabla 1. Principales marcadores microbianos utilizados para estimar la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Broderick y Merchen, 1992; Broudiscou y Jouany, 1995).

Marcador	Población marcada	Características principales		
		Coste	Técnica	Fiabilidad
<i><u>Internos:</u></i>				
DAPA, D-Alanina	Principalmente bacterias	Elevado	Compleja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiende a sobreestimar el flujo de N microbiano</li> <li>• Presencia en alimentos</li> </ul>
Bases púricas totales, BP	Todos los microorganismos	Bajo	Simple	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios en la relación BP: N entre poblaciones</li> <li>• Tiende a subestimar el flujo de N microbiano</li> <li>• Presencia en alimentos</li> </ul>
AEP	Principalmente protozoos			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gran variabilidad entre géneros de ciliados</li> <li>• Tiende a sobreestimar el flujo de N protozoario</li> <li>• Presencia en bacterias y alimentos</li> </ul>
<i><u>Externos</u></i>				
<sup>15</sup> N	Todos los microorganismos	Elevado	Compleja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El enriquecimiento difiere entre poblaciones</li> <li>• Isótopo estable, poco contaminante</li> <li>• Marca directamente la fracción N</li> </ul>
<sup>35</sup> P	Todos los microorganismos	Elevado	Compleja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El enriquecimiento difiere entre poblaciones</li> <li>• Elevada toxicidad</li> <li>• Elevados costos de eliminación de residuos</li> </ul>
<sup>35</sup> S	Todos los microorganismos	Elevado	Compleja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El enriquecimiento difiere entre poblaciones</li> <li>• Moderada toxicidad</li> <li>• Elevados costos de eliminación de residuos</li> </ul>

El Sistema Francés (INRA, 1988) utiliza el término PDIM (*protéines digestibles dans l'intestin d'origine microbienne*) para describir la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen que llega al intestino delgado del rumiante. La cantidad de PDIM depende de la cantidad de energía y nitrógeno disponible en el rumen (Tabla 2). Cada alimento está definido por 2 valores paralelos, PDIME que refleja la cantidad de proteína microbiana que es posible sintetizar a partir de la energía fermentescible y, PDIMN que permite estimar la cantidad de proteína microbiana sintetizada a partir de la cantidad de N disponible.

En el NRC (1989), la síntesis de proteína microbiana en el vacuno lechero (BCP, *bacterial and protozoal crude protein production*) se describe como una función de la ingestión de energía neta de lactación ( $EN_L$ , Tabla 2), basada en la propuesta sobre el uso del nitrógeno en los rumiantes (NRC, 1985). En esa edición del NRC se considera que, para optimizar la producción de la proteína microbiana es necesario el aporte óptimo tanto de energía como de N en el rumen. El nitrógeno proveniente de la degradación de la proteína de la dieta y el N no proteico puede ser convertido a proteína microbiana en función de la energía disponible de la fermentación; cualquier exceso de nitrógeno (en relación con la energía) se perderá como amoníaco. De igual forma, cualquier exceso de energía disponible para la fermentación (en relación con el nitrógeno disponible) condicionará la producción máxima de proteína microbiana.

En el CNCPS (Russell *et al.*, 1992), la cantidad de proteína de origen microbiano que fluye al intestino se mide como la sumatoria de proteína sintetizada por las bacterias que fermentan los carbohidratos no estructurales (NSCBact) y los estructurales (SCBact, Tabla 2). Para ello, se asume que el contenido de N en ambas fracciones microbianas es de 10%. La NSCBact depende de la eficiencia de utilización de la energía obtenida de la fermentación de los azúcares y almidones por las bacterias, y de la cantidad de carbohidratos no estructurales disponibles.



Tabla 2. Estimación de la síntesis de proteína microbiana y su eficiencia en los distintos sistemas de formulación de raciones para el vacuno lechero

Parámetro	Ecuación/valor	Referencia
	$PDIMN^1 = 0.64 \times PB \times (DT - 0.10)$	INRA (1988)
	$PDIME^2 = 0.093 \times MOF$	
Síntesis o flujo de proteína microbiana, SPM	$SPM^3 = 6.25 (-20.93 + 11.45 EN_L)$	NRC (1989)
	$SPM^4 = 0.10 (NSCBact) + 0.10(SCBact)$	CNCPS
	$SPM^5 = 0.130 \times TDN \text{ ingerido}$ (corregido), si la PD ingerida es $> 1.18$ (SPM) Si la PD es $< 1.18$ (SPM), $SPM = 0.85$ de la proteína degradable	NRC (2001)
	32 g N/kg MOF en el rumen	AFRC (1984)
	26.12 g N/kg TDN	NRC (1989)
Eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM)	Variable según:	CNCPS,
	$Y_{max}^6$ , necesidades de mantenimiento, velocidad de degradación de los CHO, nivel de fibra en el forraje, disponibilidad de péptidos y AA, ...	Russell <i>et al.</i> (1992)
	20.8 g N/kg TDN corregido	NRC (2001)

<sup>1</sup> PDIMN = proteína digestible en intestino de origen microbiano que corresponde al contenido de nitrógeno del alimento degradado en el rumen; PB = Proteína bruta; MOF = materia orgánica fermentable en rumen.

<sup>2</sup> PDIME = proteína digestible en intestino de origen microbiano que corresponde al contenido de energía del alimento que es fermentado en el rumen; DT = degradabilidad teórica de la proteína medida en bolsas de nylon.

<sup>3</sup>  $EN_L$  = Energía neta de lactación.

<sup>4</sup> Sumatoria de bacterias que fermentan los hidratos de carbono estructurales (SC) y no estructurales (NSC).

<sup>5</sup> TDN = Nutrientes digestibles totales, corregido por el nivel energético de la ración y el nivel de ingestión; PD = proteína degradable.

<sup>6</sup>  $Y_{max}$  = Eficiencia máxima teórica.

La SCBact depende de la cantidad de carbohidratos estructurales disponibles y de la eficiencia de utilización de la energía obtenida de la fermentación para la síntesis de proteína microbiana.

En el NRC (2001), se realiza una comparación del flujo estimado de N microbiano basado en la ingestión de  $EN_L$  tal como se sugiere en el NRC (1989), pero con datos bibliográficos obtenidos después de 1985. Se observa que la ecuación propuesta en el NRC (1985) y adoptada por el NRC (1989) predice razonablemente bien el flujo de N microbiano cuando los niveles de ingestión son inferiores a 30 Mcal de  $EN_L$ . Sin embargo, para niveles de ingestión superiores a 30 Mcal de  $EN_L$ , los cuales se observan comúnmente en la actualidad en el vacuno lechero de alta producción, ocurre una sobre-estimación del flujo de N microbiano. Para solventar este problema, el comité del NRC (2001) decidió desarrollar nuevas ecuaciones de predicción a partir de los datos bibliográficos (84 publicaciones posteriores a 1985) obtenidos con vacas lactantes y no lactantes (Tabla 2).

La ecuación obtenida confirma, una vez más, que la energía es el principal factor limitante de la síntesis de proteína microbiana, aunque la variable utilizada para estimarla son los nutrientes digestibles totales (*Total Digestible Nutrients*, TDN), en vez de la  $EN_L$  o la MO fermentescible. Sin embargo, al igual que en el Sistema Francés (INRA, 1988) se concluye que la energía o los indicadores indirectos de la energía fermentable podrían no ser lo suficientemente precisos para predecir el flujo de N microbiano al duodeno, sino que también es necesario incluir en la ecuación la cantidad de proteína degradable ingerida como variable de predicción. Es decir, en el NRC (2001) se toman en cuenta los aportes tanto de energía como de nitrógeno para estimar la síntesis de proteína microbiana (SPM) en el rumen. Para ello, se asume que las necesidades de proteína degradable son de  $1.18 \times SPM$ . Es decir, la síntesis de proteína microbiana se calcula como  $0.130 \times TDN$  (corregido), cuando la ingestión de proteína degradable excede a  $1.18 \times SPM$ . Cuando la ingestión de proteína degradable es menor a  $1.18 \times SPM$ , entonces, la cantidad de proteína microbiana sintetizada se calcula como 0.85 de la ingestión de proteína degradable.

### 3.4. Eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM).

La cantidad de proteína microbiana que llega al intestino delgado es función de la disponibilidad de energía y de proteína, y de la eficiencia con que los microorganismos la utilizan (Sniffen y Robinson, 1987). La eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM) se define como la cantidad de materia microbiana (medida generalmente como materia seca, proteína o N) por unidad de substrato energético fermentado o energía producida (Broudicou y Jouany, 1995), y depende de las necesidades de mantenimiento, la velocidad de crecimiento y la intensidad del reciclaje microbiano de los distintos microorganismos ruminales.

El divisor utilizado para estimar la ESPM depende de los autores y de la facilidad de determinarlo. Bauchop y Elsdén (1960) indicaron la existencia de una relación directa entre la producción de ATP y el crecimiento microbiano. Estos autores evaluaron el crecimiento de distintas bacterias y observaron una correlación entre la cantidad de ATP (derivado de la fermentación de las distintas fuentes energéticas aportadas) y la producción de células microbianas. Con ello se introdujo el término  $Y_{ATP}$ , el cual se definió como los g de MS microbiana producida por mol de ATP consumido. Los valores de  $Y_{ATP}$  obtenidos variaron entre 8.3 y 12.5 g MS/mol de ATP, con un valor promedio de 10.5 gMS/mol ATP, que fue considerado como una constante biológica. Sin embargo, trabajos posteriores (Sthouthamer y Bettenhausen, 1973; Stern *et al.*, 1978; Hespell y Bryant, 1979; Hoover *et al.*, 1984) demostraron una variabilidad mayor en el rango de valores obtenidos (entre 9.4 a 23 gMS/mol ATP).

Debido a las dificultades técnicas para la determinación precisa de la producción de ATP a partir de los AGV, especialmente *in vivo* (Czerkawski, 1976; Harrison y McAllan, 1980) y a su variabilidad, se han propuesto otras formas de expresión de la ESPM. Una de las formas más comunes de expresar la ESPM es en términos de g de N microbiano sintetizado por kg de MO aparente (MOAF) o verdaderamente (MOVF) fermentada en el rumen, asumiendo que, tanto la MOAF como la MOVF están directamente relacionadas con la liberación de ATP y, por lo tanto, con la disponibilidad energética para el

mantenimiento y el crecimiento microbiano. En consecuencia, la ESPM depende de la síntesis de proteína microbiana y de la cantidad de materia orgánica fermentada en el rumen (Sniffen y Robinson, 1987; Hoover y Stokes, 1991). Sin embargo, los microorganismos obtienen la mayor parte de la energía a partir de los carbohidratos, por lo que algunos investigadores (Hvelplund y Madsen, 1985; Nocek y Russell, 1988) sugieren que es más conveniente expresar el crecimiento microbiano en función de los carbohidratos digeridos.

Existe un gran número de experimentos y artículos de revisión sobre los factores que la afectan a la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (Maeng y Baldwin, 1976; Hespell y Bryant, 1979; Stern y Hoover, 1979; Sniffen y Robinson, 1987; Brodiscou y Jouany, 1995, Dewhruet *et al.*, 2000). En la Tabla 3 se presentan, de forma resumida, los valores medios de ESPM reseñado en algunos de estos estudios. La gran variabilidad existente tanto en el rango de valores, como en el modo de expresión de la ESPM, refleja la dificultad para establecer valores medios. Esta variabilidad se atribuye a numerosos factores como: el método de determinación, el aporte de nutrientes en la dieta, la tasa de dilución, el pH ruminal, etc. El impacto de dichos factores en la ESPM será analizado con mayor detalle en un apartado posterior.

El NRC (2001) reconoce esta variabilidad y considera que el uso de la MO fermentada como estimador único del flujo de nitrógeno microbiano al duodeno es inadecuado. Para comprobarlo, utilizaron la información bibliográfica procedente de 84 estudios y observaron que los valores oscilaban entre los 12 y los 54 g N microbiano / kg MOF en el rumen. En algunos casos se señalan valores extremos obtenidos *in vitro* que superan los 70 g N/kg MOVF (Meng *et al.*, 1999). Partiendo de los datos bibliográficos, el NRC (2001) generó una ecuación considerando los valores medidos de ESPM y el balance aparente de N ruminal (ARND):  $29.74 \text{ g N microbiano} - 0.30 \text{ ARND}$  ( $r^2=0.41$ ,  $SEy=6.5$ ). Es decir, la ecuación sugiere un valor medio de ESPM de 29.74 gN microbiano/kg MO fermentada para un balance de N disponible a nivel ruminal de cero. Sin embargo, esta eficiencia se modifica en función de la disponibilidad de N.

El NRC (1989) consideraba un balance ruminal aparente de N de -15% que representa un reciclaje neto de N endógeno del 15% de la ingestión. Sin embargo, basándose en los datos bibliográficos, en el NRC (2001) se obtiene un balance ruminal aparente de N de +1%, sugiriendo que, en promedio, el reciclaje neto de N fue cero. Si se considera que en circunstancias prácticas, el balance ruminal de N varía en un rango de +20 y -20%, la ESPM podría variar entre 24 y 36 g N microbiano / kg MO fermentada, lo que afectaría de forma considerable a la estimación del flujo de proteína microbiana total.

Tabla 3. Eficiencia de síntesis de proteína microbiana

Referencia	Forma de expresión	Media	Mínimo	Máximo
Stern y Hoover (1979)	g PB/100 g MO digestible	16.9±6.2	6.2	31.6
Hoover <i>et al.</i> (1984)	g MS/mol ATP	15.6±5.1	9.4	29.0
	g N/kg MO digestible	20.5±5.0	12.6	29.8
Strobel y Russell (1986)	g MS/mol ATP	14.1±3.4	7.4	21.2
Stokes <i>et al.</i> (1991b)	g N/kg MS digestible	20.7±6.8	10.3	34.2
Archimede <i>et al.</i> (1997)	g N/kg MOVF	23.5±9.3	-	-

El NRC (2001) no adopta la MO fermentada en el rumen como indicador de la energía disponible, porque no lo considera un indicador directo de la energía disponible para el crecimiento microbiano, y no constituye un buen predictor de la fermentabilidad de un ingrediente o de una dieta. Es por ello que continúan utilizando la ingestión de nutrientes digestibles totales (TDN, corregido) como divisor para expresar la ESPM, y la relacionan con la cantidad de proteína degradable en rumen. Aún así, se continúa adjudicando un valor fijo a la ESPM, el cual es de 130 g proteína microbiana por kg de TDN ingerido (corregido) o 20.8 g N microbiano/ kg de TDN (corregido) el cual resulta inferior si se compara con el valor utilizado en el NRC (1989), que era de 26.12 g N /kg TDN.

Los otros sistemas actuales de formulación para el vacuno lechero también adjudican un valor fijo a la ESPM (INRA, 1988; AFRC, 1993), aunque dicho valor difiere entre los distintos sistemas (Tabla 2). Lo anterior es un reflejo de la falta de consenso entre los distintos sistemas de formulación, así como de la variabilidad e imprecisión a la hora de estimar dicho parámetro. Una excepción lo constituye el CNCPS (Russell *et al.*, 1992), donde se considera que la ESPM no es constante, sino que depende de la eficiencia máxima teórica ( $Y_{max}$ , g bacteria por g de carbohidrato fermentado) y de las necesidades energéticas de mantenimiento (g de carbohidrato por g de bacteria por hora), las cuales a su vez dependen de la velocidad de degradación de los carbohidratos (ritmo de crecimiento de las bacterias por hora), la velocidad de crecimiento de las bacterias, la disponibilidad de péptidos y aminoácidos, y su relación con la disponibilidad de energía (Tabla 2).

### **3.5. Factores que afectan la síntesis de proteína microbiana y su eficiencia.**

Existen numerosas revisiones bibliográficas que describen los factores que afectan a la síntesis y a la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (Stern y Hoover, 1979; Hespell y Bryant, 1979; Clark *et al.*, 1992; Brodiuscou y Jouany, 1995; Stern *et al.*, 1994; Dewhrust *et al.*, 2000).

Dada la compleja interacción entre los distintos factores que afectan a la síntesis y/o ESPM, y la orientación de la presente tesis doctoral, la descripción de dichos factores y sus efectos se hará de forma aislada, considerando principalmente los factores relacionados con el aporte de nutrientes en la dieta y con las condiciones que pueden modificar el entorno ruminal.

#### **3.5.1. Factores relacionados con el aporte de nutrientes en la dieta.**

Los aportes de energía y de proteína necesarios para el crecimiento de los microorganismos constituyen los principales factores limitantes de la síntesis de

proteína microbiana en el rumen (Hoover y Stokes, 1991; Clark *et al.*, 1992). El crecimiento de las células microbianas depende principalmente de la degradación de la materia orgánica aportada al rumen, que proporciona la energía y los monómeros necesarios para la síntesis de los constituyentes celulares (proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos,...). La energía se obtiene fundamentalmente de la degradación de los carbohidratos (Figura 1), y el N puede provenir del nitrógeno no proteico, de la proteína verdadera y/o del aporte endógeno (Figuras 2 y 3). Otros nutrientes, como el azufre, los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (AGV-R), y los minerales y vitaminas, también son esenciales para la síntesis de proteína microbiana, aunque en una proporción menor. Numerosos factores relacionados con la dieta pueden alterar la disponibilidad de energía y nitrógeno para el crecimiento microbiano.

#### **3.5.1.1. Aportes de energía.**

Los carbohidratos (estructurales y no estructurales) constituyen la fuente principal de energía para la síntesis de proteína microbiana en el rumen, representando entre un 65-75% de la MS de la dieta de un rumiante (Sniffen *et al.*, 1983). Los productos finales de la fermentación de los carbohidratos (ATP y esqueletos carbonados) son utilizados por los microorganismos para la síntesis de proteína microbiana (Hvelplund y Madsen, 1985, Russell y Wallace, 1988; Russell y Strobel, 1993; France y Siddons, 1993). Aunque los microorganismos ruminales pueden obtener energía a partir de otras fuentes como las proteínas y las grasas (Hvelplund y Madsen, 1985), su contribución al aporte global de energía utilizada para la síntesis de proteína microbiana es reducida. Por un lado, representan una menor proporción en las dietas comúnmente utilizadas en rumiantes y, por el otro, debido al menor aporte energético de estos substratos cuando son fermentados anaeróbicamente. Así, la proteína aporta la mitad de la energía que los hidratos de carbono (Demeyer y Van Nevel, 1979; Tamminga, 1979), y de cada mol de triglicéridos aportado, sólo el glicerol puede ser fermentado en el rumen (Hvelplund y Madsen, 1985).

El hecho de considerar la disponibilidad de energía como el principal determinante del crecimiento microbiano está reconocido por los distintos modelos (empíricos y mecanísticos) utilizados por los distintos sistemas de formulación para predecir la síntesis de proteína microbiana (Dijkstra *et al.*, 1998). En los sistemas de formulación que utilizan modelos empíricos (NRC, 1989, 2001; INRA, 1988; AFRC, 1993), la síntesis de proteína microbiana se calcula a partir de la cantidad de energía disponible o materia orgánica fermentable, adjudicando un valor fijo de ESPM, aunque en algunos casos ésta puede ser corregida por un posible déficit de N (Dijkstra *et al.*, 1998; NRC, 2001). Los sistemas que utilizan modelos mecanísticos para describir la función ruminal en el vacuno lechero (Dijkstra *et al.*, 1992; Lescoat y Sauvant, 1995), consideran que la síntesis de proteína microbiana depende de la cantidad y del tipo de materia orgánica disponible, de la utilización de la materia orgánica para las funciones de mantenimiento y crecimiento microbiano y, en una extensión limitada, de las interacciones microbianas. El sistema Cornell (CNCPS, Russell *et al.*, 1992) puede ser clasificado como mixto, ya que posee componentes empíricos y mecanísticos. El componente mecanístico proporciona estimaciones que relaciona la energía utilizada para las funciones de mantenimiento y crecimiento microbiano con la disponibilidad del sustrato, pero la degradación del sustrato está representada sin la interacción de efectos entre los nutrientes (carbohidratos y N) o los efectos de la actividad microbiana en la degradación de la materia orgánica en el rumen (componente empírico).

En el CNCPS, el componente mecanístico divide el ecosistema microbiano ruminal en dos grupos en función del tipo de carbohidratos que fermentan, (SCBact y NSCBact, Russell *et al.*, 1992). Esta clasificación obedece a que ambas poblaciones difieren en cuanto a las necesidades de mantenimiento y a la velocidad de crecimiento. Las bacterias celulolíticas (SCBact) se caracterizan por un crecimiento lento y unas necesidades energéticas de mantenimiento bajas (0.05 g de carbohidrato por gramo de bacteria por hora). Las bacterias amilolíticas (NSCBact), por su parte, se caracterizan por sus elevadas necesidades energéticas para el mantenimiento (0.15 g de carbohidrato por gramo de bacteria por hora) y una velocidad de crecimiento rápida (Russell *et*



*al.*, 1992). Esta diferenciación en cuanto a la cantidad de energía utilizada por los microorganismos ruminales para las funciones de mantenimiento y crecimiento indica que la cantidad de proteína microbiana sintetizada o la eficiencia energética de dicho proceso varía con el tipo de substrato fermentado y su ritmo de degradación (Demeyer, 1991; Stokes *et al.*, 1991a; Stern *et al.*, 1994; Nozière y Michalet-Doreau, 1997).

También existen grandes diferencias en cuanto al grado y velocidad de degradación de los carbohidratos entre y dentro de las distintas fuentes de carbohidratos aportados en la dieta (Dehority, 1993; Sniffen *et al.*, 1992; Van Soest, 1994; NRC, 2001). El CNCPS (Sniffen *et al.*, 1992) toma en cuenta dichas diferencias al estimar la cantidad de energía aportada por los carbohidratos de la dieta y que están disponibles para el crecimiento microbiano. Los carbohidratos se dividen en diferentes fracciones dependiendo de su velocidad de degradación (Fracción A = rápida: azúcares; Fracción B1 = intermedia: almidones; Fracción B2 = lenta: componentes disponibles de la pared celular; y fracción C = fibra indigestible). Dichas fracciones se estiman a partir del contenido de carbohidratos estructurales, carbohidratos no estructurales y fibra indigestible, mediante el análisis secuencial de FND de los diferentes ingredientes. Los carbohidratos no estructurales incluyen azúcares (Fracción A), almidones y pectinas (Fracción B1). Los carbohidratos estructurales (que corresponde a la fracción B2) se determina restando la fracción C (contenido de lignina x 2.4) del FND libre de cenizas corregido por la proteína asociada. El ritmo fraccional de degradación de los carbohidratos estructurales y no estructurales se asignan a partir de datos de la literatura. A la fracción A se le adjudica un ritmo de fermentación de 300%/h. El ritmo de degradación de la fracción B1 tiene un valor medio entre un 3 y 8%/h, mientras que el ritmo de degradación de la fracción B2 se considera variable (alrededor del 50%) según el tipo de ingrediente. El ritmo de degradación difiere entre gramíneas y leguminosas (Van Soest, 1994), el almidón y las pectinas (Bach *et al.*, 1999) y entre los distintos cereales, dependiendo del tipo, su estructura y el procesado al que haya sido sometido (Herrera-Saldana *et al.*, 1990; Nocek y Tamminga, 1991; McAllister *et al.*, 1990, 1993). La cantidad total de carbohidratos que son degradados en el rumen se

calcula como la sumatoria de cada una de las fracciones (A, B1 y B2), para lo cual se utilizan ecuaciones que incluyen los distintos ritmos relativos de degradación (Kd) y de paso (Kp) en el rumen para cada uno de los ingredientes.

El hecho de utilizar carbohidratos con diferente ritmo y/o velocidad de degradación puede afectar a la síntesis de proteína microbiana y a la ESPM, dado que modifican el perfil de liberación de energía para el crecimiento microbiano, aunque los efectos son complejos y muy variables. En general, los resultados obtenidos *in vitro* indican que los carbohidratos no estructurales favorecen la síntesis y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Demeyer y Van Nevel (1986), en un experimento realizado *in vitro*, observaron un incremento en la síntesis de proteína microbiana (0.95 a 1.33 g/d) y en la ESPM (40.6 a 54.5 g N microbiano/kg MOF) cuando la cantidad de almidón de maíz se incrementó de 4.0 a 31.4% en sustitución de celulosa. Stokes *et al.* (1991a) llegaron a una conclusión similar al señalar un incremento en la síntesis de proteína microbiana (1.02 a 1.63 g/d) y en la ESPM (18.2 a 22.6 g N microbiano/kg MS digestible) cuando el contenido de carbohidratos no estructurales se incrementó de 25 a 54% de la materia seca de la dieta. En experimentos *in vitro*, cuando la disponibilidad de energía es elevada (como ocurre con dietas ricas en almidones), la velocidad de crecimiento de las bacterias amilolíticas es elevada. A medida que la velocidad de crecimiento aumenta, la proporción de energía destinada para el mantenimiento se diluye, lo cual explica la mejora en la eficiencia de crecimiento bacteriano observada bajo estas condiciones (Sniffen *et al.*, 1983; Russell *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos *in vivo* indican que la ESPM es mayor con dietas a base de forrajes comparado con dietas a base de concentrados (Rode *et al.*, 1985; Hvelplund y Madsen, 1985; Demeyer y Van Nevel, 1986, Archimede *et al.*, 1997), contrario a lo observado en experimentos *in vitro*. La inclusión de altos niveles de carbohidratos no estructurales en la dieta, los cuales son rápidamente fermentados en el rumen, provoca cambios en el patrón de fermentación. Este tipo de carbohidratos favorece un incremento en la proporción de propionato a expensas del acetato, y la acumulación potencial de lactato, provocando una

disminución en el pH ruminal y afectando a la degradabilidad de la materia orgánica y al crecimiento microbiano (Russell y Wilson, 1996). Tales efectos ayudan a explicar la menor ESPM y la menor síntesis de proteína microbiana observada *in vivo* cuando se suministran dietas ricas en azúcares y almidones (Russell y Wallace, 1988; Demeyer, 1991).

No obstante, la inclusión de cantidades moderadas de carbohidratos no estructurales en dietas a base de forrajes favorece tanto la síntesis de proteína microbiana (g N microbiano/d) como la ESPM (Archimede *et al.*, 1997), debido fundamentalmente al incremento en la disponibilidad de sustrato y en el ritmo de crecimiento de las bacterias asociadas con la fracción líquida del contenido ruminal (Dewhurst *et al.*, 2000). Bourquin *et al.* (1994), en un experimento realizado *in vivo*, observaron un incremento de 24.2% en el flujo de N microbiano al duodeno (151.7 vs 200.0 g N microbiano/d) cuando el nivel de concentrado se incrementó de 4 a 40% en la dieta. En la revisión de Archimede *et al.* (1997) se llega a una conclusión similar. El flujo de N microbiano al duodeno se incrementó con el nivel de inclusión de carbohidratos no estructurales, alcanzando un valor óptimo con un nivel de inclusión cercano al 50%, a partir del cual el flujo microbiano comenzó a disminuir. Por otra parte, aunque la ESPM también se incrementó con el nivel de inclusión de carbohidratos no estructurales, la máxima eficiencia se obtuvo con niveles de concentrado en la dieta cercanos al 40%.

Aún cuando existen diferencias en el ritmo de degradación entre los distintos tipos de cereales, su efecto en la síntesis y eficiencia de síntesis de proteína microbiana no es concluyente. McCarthy *et al.* (1989) no observaron un incremento en el flujo de N microbiano al intestino delgado o en la ESPM en vacuno lechero cuando se utilizó cebada en vez de maíz como fuente de carbohidratos no estructurales. Por el contrario, Oldham *et al.* (1979) y Spicer *et al.* (1986) observaron un incremento en el flujo de N microbiano al duodeno cuando la cebada reemplazó completamente al maíz en dietas para vacas en lactación. Sin embargo, la ESPM no difirió entre los tratamientos. Otros resultados (Rode y Satter, 1988; Kung *et al.*, 1992) indicaron que la fuente de carbohidratos (maíz o cebada) no afectó ni al flujo de N microbiano ni a la

ESPM. Los resultados de Overton *et al.* (1995), quienes utilizaron diferentes combinaciones de maíz y cebada como fuente de almidón en la dieta (100:0; 75:25; 50:50; 25:75 y 0:100), tampoco son concluyentes, ya que la síntesis y la ESPM no siempre se incrementaron en respuesta al reemplazo del maíz por cebada.

### 3.5.1.2. Aportes de nitrógeno.

El nitrógeno es, desde el punto de vista cuantitativo, el otro factor relacionado con la dieta que más limita el crecimiento y la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Stern y Hoover, 1979; NRC, 2001). Como se indicó anteriormente, los microorganismos ruminales pueden hacer uso de distintas fuentes de nitrógeno degradable (amoníaco, AA y péptidos), provenientes de la degradación de la proteína aportada en la dieta, así como del amoníaco derivado de las fuentes de nitrógeno no proteico o de la urea reciclada a través de la pared del rumen y de la saliva. Cuando el aporte de N (tipo y cantidad) es inadecuado, disminuye el crecimiento microbiano y se reduce la actividad fermentativa (Hoover y Miller, 1992; Clark *et al.*, 1992; Stern *et al.*, 1994).

Los sistemas actuales de formulación de raciones reconocen la importancia del concepto de degradabilidad de la proteína como un factor que afecta al crecimiento microbiano y a la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (INRA, 1989; NRC, 1989, 2001; Russell *et al.*, 1992; Sniffen *et al.*, 1992; AFRC, 1993). Una característica relevante de dichos modelos es que consideran que la proteína de los alimentos consiste en múltiples fracciones que difieren en sus ritmos de degradación, y que la desaparición ruminal de la proteína es el resultado de dos actividades simultáneas, el ritmo fraccional de degradación y de paso (NRC, 2001).

Uno de los modelos más complejos es el CNCPS (Sniffen *et al.*, 1992), donde la proteína de la dieta es dividida en cinco fracciones (A, B1, B2, B3 y C) con diferentes ritmos de degradación ruminal, a partir de las cuales se puede estimar la cantidad de proteína degradable y no degradable en rumen. Sin embargo, en este sistema se considera que la síntesis de proteína microbiana o

su eficiencia en el rumen depende no sólo de la degradabilidad de la proteína, sino también del tipo de población microbiana asociada (Tabla 2). Así, por ejemplo, el modelo considera que las SCBact utilizan amoníaco como única fuente de N, mientras que las NSCBact pueden utilizar hasta un 66% del N en forma de AA y péptidos (Russell *et al.*, 1992).

En el NRC (2001) también se consideran los aportes de proteína degradable en la dieta como un factor que limita a la síntesis de proteína microbiana y, lo incluye en los modelos de predicción de la misma (Apartado 3.3, Tabla 2). Para estimar la cantidad de proteína degradable de los diferentes ingredientes se desarrolló un modelo a partir de datos bibliográficos (801 observaciones de un total de 170 experimentos) basados en el método *in situ* de degradación de la proteína, en la cual la proteína del alimento se divide en tres fracciones: A = NNP; B = fracción de la proteína verdadera potencialmente degradable, y C = fracción de la proteína totalmente indegradable.

El uso de suplementos proteicos de baja degradabilidad ruminal puede limitar la cantidad de N disponible (amoníaco, péptidos y AA) para los microorganismos presentes en el rumen (Cecava *et al.*, 1990a). Si tomamos como ejemplo el ritmo fraccional de degradación de diferentes fuentes proteicas (NRC, 2001), podemos observar que este varía entre 1.4%/h para la harina de pescado Menhaden hasta 29.2%/h para la harina de girasol. Si se asume un ritmo fraccional de paso para cada ingrediente de 7%/h, entonces el rango de degradabilidad de la fracción B varía entre 16.7 y 80.7% dependiendo del tipo de fuente proteica, de las cuales las fuentes de origen animal corresponden a las de menor degradabilidad (Stern *et al.*, 1994).

En líneas generales los resultados obtenidos indican que la síntesis de proteína microbiana (g/d) y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana se incrementan en respuesta al incremento en el contenido de proteína degradable en la dieta (Stokes *et al.*, 1991a; Clark *et al.*, 1992; Erasmus *et al.*, 1994). Sin embargo, el aporte de proteína degradable en exceso puede ocasionar una acumulación de amoníaco en el rumen (Lu *et al.*, 1988). Stokes *et al.* (1991a) evaluaron el efecto de incluir cantidades crecientes de proteína degradable en la

dieta, y observaron un incremento lineal en la ESPM cuando la proteína degradable ingerida se incrementó de 4.1 hasta 19.2% de la MS de la dieta. Igualmente, Hoover y Stokes (1991), en su artículo de revisión, concluyeron que tanto la síntesis (kg proteína microbiana/d) como la ESPM (g N bacteriano/kg CHO digerido) se incrementan en respuesta al incremento en el la cantidad de proteína degradable ingerida. Por el contrario, Calsamiglia *et al.* (1995) no observaron diferencias en la síntesis (g N bacteriano/d) ni en la ESPM (g N bacteriano/kg MOVF) cuando se utilizaron 8 fuentes de proteína diferentes, cuya degradabilidad ruminal varió entre el 11% y el 100%. En este caso, los autores señalan que los aportes de proteína degradable en ningún caso estuvieron por debajo del 9% de la materia seca ingerida y, por lo tanto, no limitaron el crecimiento microbiano.

El producto final de la degradación proteica es el amoníaco (Figura 3), el cual se considera la principal fuente de N para la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Hespell y Bryant, 1979; Baldwin y Allison, 1983; Wallace y Cotta, 1988; Mackie y White, 1990). Estudios realizados con sales de amonio o urea marcados con <sup>15</sup>N infundido intra-ruminalmente o como dosis única demostraron que los valores de N microbiano derivado del amoniaco variaron en un rango entre 18 y 100% (Salter *et al.*, 1979). El amoníaco puede ser utilizado por la mayoría de las especies bacterianas y es esencial para las celulolíticas (Nolan, 1993). Por lo tanto, una deficiencia de amoníaco en el rumen puede provocar un descenso del flujo de proteína microbiana al intestino delgado (Hume 1970b) y el exceso de amoniaco se relaciona con una mayor excreción urinaria de N (Dijkstra y Bannink, 2000). Por ello, se ha sugerido el uso de la concentración de N amoniacal en el rumen como un índice que nos permite valorar la disponibilidad de N en el rumen y estimar la posibilidad que sea un factor limitante para el crecimiento microbiano.

La concentración ruminal de amoniaco resulta del balance entre el ritmo relativo de entrada (aportes de NNP, fermentación de la proteína de la dieta, proteína y urea endógena, ...) y eliminación (incorporación en la proteína microbiana, absorción a través de la pared ruminal, flujo al tracto digestivo

inferior) del mismo (Nolan, 1993). La concentración ruminal de amoníaco fluctúa dependiendo de factores tales como el régimen de alimentación, el momento de muestreo post-ingestión, la disponibilidad de energía, las condiciones experimentales, etc. (Satter y Slyter, 1974; Leng y Nolan, 1984; Brodiscou y Jouany, 1995). Es difícil, por lo tanto, establecer un valor que defina la concentración óptima de amoníaco en el rumen.

Aunque existe controversia sobre la concentración mínima de amoníaco para maximizar la ESPM, el valor de 5 mg/dL obtenido *in vitro* por Satter y Slyter (1974) y Russell y Strobell (1987) se puede utilizar como referencia. No obstante, el umbral parece incrementarse cuando se usan substratos fácilmente fermentables (Brodiscou y Jouany, 1995) y en experimentos realizados *in vivo*. En este último caso, los resultados indican que la concentración óptima está cercana a 10 mg/dL (Van Soest, 1994; Brodiscou y Jouany, 1995). Sin embargo, el rango de valores óptimos señalados por distintos autores son muy variables, desde 1.7 (Shaefen *et al.*, 1980) a más de 23.5 mg/dL (Mehrez *et al.*, 1977). La falta de concordancia entre autores puede deberse parcialmente a las diferencias en los métodos utilizados para determinar el amoníaco, pero la variabilidad demuestra que el crecimiento bacteriano depende de otros muchos factores además de la concentración de N amoniacal.

Los AA y péptidos libres también pueden incorporarse directamente a la proteína microbiana por ciertos grupos bacterianos (Cotta y Russell, 1982; Russell y Sniffen, 1984; Broderick *et al.*, 1991; Griswold *et al.*, 1996), principalmente las bacterias amilolíticas (Russell *et al.*, 1992; Cruz-Soto *et al.*, 1994; Wallace, 1996). Sin embargo, las estimaciones de cuánta proteína microbiana sintetizada deriva del amoníaco respecto a otras formas de nitrógeno resulta muy variable (Salter *et al.*, 1979). Baldwin y Allison (1983), estimaron que entre un 20 y un 40% de la proteína que se degrada en el rumen es utilizada en forma de AA y péptidos libres por los microorganismos. Por el contrario los resultados de estudios *in vitro* (Russell *et al.*, 1983) indican que los microorganismos que fermentan carbohidratos no estructurales pueden derivar hasta el 66% de su N de péptidos y AA, cuando hay disponibilidad de éstos en el

medio. Existe evidencia que los AA, y especialmente los péptidos, son estimulantes del crecimiento de los microorganismos cuando se utilizan fuentes de energía de fermentación rápida y en grandes cantidades (Cotta y Russell, 1982; Russell *et al.*, 1983; Argyle y Baldwin, 1989; Chen *et al.*, 1987; Cruz-Soto *et al.*, 1994; Russell, 1998a), y son de especial interés cuando la degradación de carbohidratos y proteínas en el rumen no suceden en sincronía (Dijkstra *et al.*, 1998), o cuando se utilizan fuentes de NNP (Hume, 1970b). Por el contrario, el efecto no es tan evidente cuando los substratos energéticos son de degradación lenta (NRC, 2001).

Maeng y Baldwin (1976), en un experimento *in vitro*, concluyeron que la sustitución parcial de urea por AA estimuló tanto el crecimiento como la eficiencia de síntesis de proteína microbiana. La relación óptima se obtuvo con un 75% de urea y 25% de AA como fuentes de N. Otros resultados obtenidos *in vivo* (Hume, 1970b) e *in vitro* (Russell y Sniffen, 1984) indican que el uso de AA puede incrementar la producción bacteriana en un 28 y 19%, respectivamente. Por el contrario, Cruz-Soto *et al.* (1994) no observaron una respuesta positiva en el crecimiento microbiano al variar las fuentes de N aportado. En otro experimento (Jones *et al.*, 1998) se observó un incremento en la síntesis de proteína microbiana, pero no en la ESPM, cuando se utilizaron varios niveles de péptidos en sustitución de urea como fuente de nitrógeno para los microorganismos. Griswold *et al.* (1996) tampoco observaron diferencias en la ESPM al utilizar fuentes de proteína verdadera, urea, AA y péptidos o combinaciones de 50% entre ellos, aunque sí una reducción en el flujo de N bacteriano cuando se utilizaron péptidos y AA. La mejora en la ESPM que se observó en algunos casos se explica porque la presencia de AA pre-formados parece estar relacionada con una reducción en los costes energéticos de los procesos de síntesis de AA (Demeyer y Van Nevel, 1986; Russell, 1998a).

### **3.5.1.3. Sincronización en los aportes de energía y proteína.**

Actualmente se acepta que para lograr una mayor síntesis de proteína microbiana y maximizar la ESPM es más importante el equilibrio en el patrón de



liberación de la energía y el nitrógeno que evaluar los aportes de forma individual.

El concepto de sincronización ruminal se propuso como un marco conceptual para simplificar la descripción de los aportes de energía y proteína a los microorganismos ruminales (Stern *et al.*, 1994; NRC, 2001). El aporte no sincronizado se traduce en una menor eficiencia de utilización de la energía o del N disponible, dependiendo del nutriente aportado en exceso. Una disminución en la ESPM puede ocurrir como consecuencia de una utilización ineficiente de los carbohidratos cuando el amoníaco es limitante (Russell y Strobel, 1987). También puede ocurrir por un aporte limitado de energía fermentable en relación con el aporte de nitrógeno, o por diferencias en el patrón de liberación de los substratos fermentables (Dewhurst *et al.*, 2000; NRC, 2001).

El objetivo final de la sincronización es suplir los nutrientes necesarios para cubrir las necesidades de los microorganismos para su crecimiento en la proporción y tiempo adecuados. Los microorganismos requieren la energía, el amoníaco y/o los AA y péptidos de forma simultánea, así como ciertos factores de crecimiento necesarios para la síntesis celular. Un aporte sincronizado de energía fermentable y N degradable resulta en una mejor utilización de los nutrientes en el rumen y un mayor flujo de proteína microbiana al duodeno (Dewhurst *et al.*, 2000). Sin embargo, a menudo se observan situaciones de manejo alimentario donde los aportes de energía (ATP) y N (amoníaco) no ocurren en sincronía, por lo que se produce una utilización ineficiente de los substratos fermentables y una síntesis de proteína microbiana reducida (NRC, 2001).

Una alimentación a base de ensilados constituye un ejemplo claro de la importancia de la sincronización en los aportes de energía y N para la síntesis de proteína microbiana (Siddons *et al.*, 1985). Durante el proceso de ensilado, los carbohidratos no estructurales se fermentan y la concentración de estos nutrientes disminuye. Al mismo tiempo, el proceso de fermentación degrada la proteína a amoníaco, incrementándose la disponibilidad de N (Beever, 1993). Los resultados de Rooke *et al.* (1987) ilustran el efecto negativo que ejerce la

falta de sincronización en los aportes de energía y N sobre la síntesis y eficiencia de síntesis de proteína microbiana cuando se utilizan ensilados en la dieta. El experimento consistió en el suministro de ensilado (dieta basal) a vacas lecheras no lactantes a las cuales se hicieron infusiones intra-ruminales de nutrientes específicos. La infusión de soluciones iso-nitrogenadas conteniendo urea o caseína no provocaron incrementos significativos en la síntesis neta de proteína microbiana o en flujo de N no amoniacal al intestino delgado, pero sí un incremento sustancial en la concentración de amoníaco en el rumen. Por el contrario, la infusión intra-ruminal de jarabe de glucosa provocó un incremento significativo de la síntesis de N microbiano y en el flujo de N no amoniacal, con una reducción en la concentración de amoníaco en el rumen cuando se comparó con el tratamiento control. Cuando se infundió conjuntamente el jarabe de glucosa y la caseína en cantidades similares a las utilizadas en las infusiones individuales, se observó una mayor síntesis de proteína microbiana, con una marcada mejora en la ESPM.

Resultados de varios estudios indican que el aporte sincronizado de fuentes de carbohidratos no estructurales y de proteína rápidamente degradable estimulan una mayor síntesis y/o ESPM, si se compara con el uso de fuentes de energía y proteína de degradación lenta, o cuando el patrón de liberación de nutrientes no ocurre en sincronía (Herrera-Saldana *et al.*, 1990; Stokes *et al.*, 1991a, b; Aldrich *et al.*, 1993; Sinclair *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos *in vivo* por Herrera-Saldana *et al.* (1990) constituyen un buen ejemplo para ilustrar el efecto positivo de la sincronización de la disponibilidad de energía y proteína en la ESPM cuando se utilizan fuentes de carbohidratos y proteína rápidamente degradables. Para ello utilizaron una dieta a base de cebada y harina de semillas de algodón (fuentes de proteína y almidón rápidamente degradables) y la compararon con otra dieta cuyos ingredientes eran menos degradables (mijo y residuos de destilería). El flujo de proteína microbiana fue mayor (3.00 kg/d) cuando se combinaron las fuentes de carbohidrato y proteína rápidamente fermentables, y se redujo cuando se utilizaron las fuentes de degradación lenta (2.14 kg/d), o cuyo patrón de fermentación no ocurrió en sincronía (cebada-residuos de cervecería o mijo-semilla de algodón; 2.64 y 2.36 kg/d,

respectivamente). La ESPM (g proteína microbiana/ kg MOVF) mostró un patrón de comportamiento similar al flujo de proteína microbiana.

El efecto de variar los niveles de carbohidratos no estructurales y la cantidad de proteína degradable en la dieta fue evaluada por Stokes *et al.* (1991a, b). En un primer experimento realizado *in vitro* (Stokes *et al.*, 1991a) evaluaron el efecto de combinar niveles crecientes de carbohidratos no estructurales (25, 37 y 54% de la MS) con varias concentraciones también crecientes de proteína degradable (4 a 19% de la MS). Los resultados obtenidos mostraron un incremento lineal en la síntesis de proteína microbiana (g/d) y un incremento (con efecto cuadrático) en la ESPM a medida que se incrementó la proporción de carbohidratos no estructurales y de proteína degradable en la dieta. En un segundo experimento, pero esta vez *in vivo*, Stokes *et al.* (1991b) formularon tres dietas con diferente relación entre carbohidratos no estructurales y proteína degradable (Dieta 1 = 38.2:13.7; Dieta 2 = 31.3:11.8, y Dieta 3 = 24.4:9.0% de la MS). Las animales que consumieron las dietas 1 y 2 se caracterizaron por tener una mayor síntesis de proteína microbiana que aquellos animales que consumieron la dieta 3. Estos autores concluyeron que niveles de carbohidratos en la dieta mayores a 24% y de proteína degradable por encima del 9% de la MS de la dieta optimizan el flujo de la proteína microbiana procedente del rumen.

En otros casos, el aporte sincronizado de nutrientes mediante el uso de distintas fuentes de energía y proteína rápidamente degradable no se correspondió con un incremento significativo en la síntesis o eficiencia de síntesis de proteína microbiana (Cecava *et al.*, 1991; Stokes *et al.*, 1991b; Feng *et al.*, 1993; Casper *et al.*, 1999). El punto central donde convergen las conclusiones de dichos trabajos tiene que ver con la cantidad de carbohidratos no estructurales aportados en la dieta, por sus efectos sobre la fermentación ruminal. En el experimento realizado por Feng *et al.* (1993) en vacuno lechero, donde se compararon dos niveles de inclusión de carbohidratos no estructurales en la dieta (39 vs 29% de la MS), observaron una menor síntesis (198.2 vs 255.6 g N microbiano/d) y eficiencia de síntesis de proteína microbiana (25.3 vs 32.4

g/kg MO digerida) cuando el nivel de inclusión de carbohidratos no estructurales fue 39 vs 29% de la MS de la dieta. La disminución en la síntesis y ESPM se relacionó con una disminución en los ritmos de renovación de las fases líquida y sólida del contenido ruminal, lo cual incrementa el reciclaje microbiano y hace que una mayor cantidad de energía y N sea utilizada para el mantenimiento en vez del crecimiento microbiano. De igual forma, Stokes *et al.* (1991b) en el experimento reseñado anteriormente, no observaron diferencias en la síntesis de proteína microbiana entre las dietas 1 y 2, donde se incrementó tanto el nivel de carbohidratos no estructurales como de proteína degradable. En dicho experimento, los autores también sugieren que los cambios en el ambiente ruminal (pH y tasa de dilución) pudieron ser los responsables de las alteraciones observadas en el crecimiento y en la eficiencia microbiana.

El efecto de la sincronización en la digestión de la proteína y los carbohidratos y sus efectos sobre la síntesis y eficiencia de síntesis de proteína microbiana constituye un tema de debate en el NRC (2001). El efecto de la sincronización se evalúa teniendo en cuenta la cantidad, el tipo y la velocidad de degradación de las fuentes de energía y de proteína aportada, la frecuencia de los aportes, el ritmo de paso en el rumen, etc. El análisis se realiza desde una perspectiva de cómo optimizar el uso de las fuentes de energía y proteína como una estrategia para estimular la síntesis o eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Después de un análisis crítico de datos experimentales coinciden con lo ya señalado anteriormente; es decir, que existen ciertas condiciones donde el aporte sincronizado de fuentes de energía y proteína se relacionan con una mayor síntesis o eficiencia de síntesis de proteína:

- i) “El uso sincronizado de fuentes de almidón y proteína rápidamente degradables”. Para demostrar la validez de este supuesto reseñan los resultados obtenidos en estudios realizados tanto en ovino (2 experimentos) como en vacuno lechero (3 experimentos).
- ii) “Incrementar los aportes de carbohidratos no estructurales en la dieta o el uso de fuentes de carbohidratos y de proteína más degradables en la dieta”. Para demostrar este supuesto, una vez más, aportan un número

significativo de datos bibliográficos obtenidos tanto *in vivo* como en fermentadores (8 referencias). Además, indican que el flujo post-ruminal de proteína microbiana (datos de 16 experimentos) se incrementó en un promedio de 10% cuando fuentes de almidón de degradación lenta (p.e. maíz) fueron reemplazadas por otras fuentes de degradación rápida (p.e. cebada), aunque la eficiencia de conversión de la MO digerida a proteína microbiana no siempre resultó favorecida.

Sin embargo, aunque en la mayoría de los casos estas premisas son ciertas, ocurren situaciones donde no siempre el aporte sincronizado de fuentes de proteína y de carbohidratos está relacionado con una respuesta favorable en la síntesis y/o eficiencia de síntesis de proteína microbiana (NRC, 2001). Así, por ejemplo, basándose en los resultados de Henning *et al.* (1993), argumentan que el solo hecho de mejorar el grado de sincronización en el ritmo de liberación entre la energía y el nitrógeno en el rumen no necesariamente se produce una mayor masa microbiana, sino que también es importante que los aportes de la energía, y posiblemente del N, se produzcan de forma gradual o constante. Además, señalan que la interacción con otros factores relacionados con el animal (p.e. el estado fisiológico del animal, por sus efectos en la ingestión de alimento y la cinética ruminal), la fuente de N aportada (p.e. aportes simultáneos de proporciones adecuadas de amoníaco, AA y péptidos) o los cambios en el entorno ruminal (pH, tasas de dilución) que se suceden cuando se incluyen elevadas proporciones de carbohidratos no estructurales o proteína degradable en la dieta, pueden explicar la falta de respuesta a la sincronización descrita por algunos autores (Stokes *et al.*, 1991b; Feng *et al.*, 1993; Casper *et al.*, 1999).

El NRC (2001) concluye que a pesar de que está claramente establecido que tanto los carbohidratos como la proteína son los principales nutrientes que requieren los microorganismos ruminales, las fuentes más adecuadas y las cantidades necesarias para permitir un máximo crecimiento microbiano están aún por determinarse con exactitud. Además, indica que es difícil determinar si el incremento en la síntesis de proteína microbiana que se reseñada por varios autores (Herrera-Saldana *et al.*, 1990; Aldrich *et al.*, 1993; Sincalir *et al.*, 1995)

es un efecto directo de la sincronización, o es un factor asociado con la manipulación de los ingredientes, tal como sugirió Dewhurst *et al.* (2000).

#### **3.5.1.4. Otros factores relacionados con la dieta o con la disponibilidad de nutrientes que afectan a la síntesis de proteína microbiana en el rumen.**

Además de la energía y la proteína, existen otros nutrientes que son aportados en la dieta, como son las grasas, el azufre (S), el fósforo (P), el magnesio (Mg), las vitaminas, los AGV-R, etc. (Stern y Hoover, 1979; Stern *et al.*, 1994; Brodiscou y Jouany, 1995; Jouany *et al.*, 1995; Dewhurst *et al.*, 2000), que pueden limitar la síntesis y/o la eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Además, estrategias como la manipulación de ciertos ingredientes de la dieta (Broderick *et al.*, 1991; Fahey *et al.*, 1993; Weimer, 1996; Russell y Wilson, 1996) o la inclusión de ciertos aditivos como los ionóforos (Dinius *et al.*, 1976; Yang y Russell, 1993; Jalc y Laukova, 2002), los probióticos (Wallace, 1994, 1996), los ácidos orgánicos (Martin, 1998) o los aceites esenciales (Jalc y Laukova, 2002), pueden alterar o propiciar cambios en la síntesis y/o eficiencia de síntesis de proteína microbiana por sus efectos sobre el patrón de fermentación o el metabolismo del N en el rumen.

Las grasas constituyen una fuente de energía densa, pero no proporcionan energía fermentable para el crecimiento microbiano en el rumen (Stern *et al.*, 1994; Dewhurst *et al.*, 2000). La adición de grasas en proporciones moderadas en la dieta pueden afectar a la síntesis de proteína microbiana en el rumen al reducir el aporte de carbohidratos en la dieta, y su fermentabilidad. Varios autores señalan que la adición de grasas en la dieta mejora la ESPM (Sutton *et al.*, 1983; Jenkins y Palmquist, 1984; Klusmeyer *et al.*, 1991), la cual puede ser explicado por:

- i) La reducción en el número de protozoos, con lo que se reduce el reciclaje de N bacteriano en el rumen;
- ii) La reducción en la digestión de la MO en el rumen.

Sin embargo, cuando los aportes de grasa en la dieta son excesivos (superiores al 8% de la MS de la dieta), puede ocurrir una reducción en la ESPM, ya que resulta tóxica para las bacterias, provocando una inhibición de la actividad microbiana en el rumen (Schingoethe, 1988).

El aporte de AGV-R también puede afectar a la síntesis y eficiencia de síntesis de proteína microbiana en el rumiante (Broudiscou y Jouany, 1995). Los AGV-R constituyen un factor de crecimiento esencial, sobre todo para las bacterias celulolíticas (Hume, 1970a; Hoover, 1986). Un aporte suplementario de estos ácidos se recomienda cuando la cantidad de proteína verdadera aportada en la dieta es baja (por ejemplo, forrajes o ensilados de baja calidad), cuando se aporta NNP (o falta proteína verdadera degradable) o cuando se produce una inhibición en el proceso de desaminación (Broudiscou y Jouany, 1995). Aún cuando se han obtenido evidencias *in vitro* que señalan un efecto favorable del uso de estos ácidos grasos (Chalupa y Bloch, 1983; Russell y Sniffen, 1984), los resultados obtenidos *in vivo* o en cultivos continuo no son concluyentes. Hume (1970a) observó un incremento del 14% en la cantidad de proteína microbiana sintetizada en ovinos, mientras que Varga *et al.* (1988), en un experimento realizado con fermentadores, no observaron ningún incremento en la síntesis de proteína microbiana como respuesta a la inclusión de AGV-R. Gunter *et al.* (1991), quienes suministraron cantidades variables de ácidos grasos de cadena ramificada a terneras alimentadas con heno de gramíneas de baja calidad, tampoco observaron ningún efecto favorable en el patrón de fermentación o en el crecimiento microbiano.

El S es necesario en la síntesis de metionina (Met) y cisteína (Cys), y su carencia puede limitar la síntesis de proteína microbiana, especialmente cuando se utilizan fuentes de NNP (Stern y Hoover, 1979) y/o forrajes de baja calidad (Broudiscou y Jouany, 1995). Algunos resultados obtenidos con ovinos (Hume y Bird, 1970c), señalan como óptima una relación N:S de 10:1 para maximizar el crecimiento microbiano. En otros casos, las necesidades de S se determinan en función de la cantidad de materia orgánica fermentada en el rumen, y se sugiere un aporte de 2.5 a 3.0 g S/kg MOF (Broudiscou y Jouany, 1995).

El P se requiere para la formación de ácidos nucleicos, y los microorganismos ruminales contienen elevadas proporciones de ADN y ARN en su contenido celular, por lo que las necesidades de P son elevadas (Van Houtert, 1993; Van Soest, 1994). La deficiencia de P se relaciona con una disminución de la ESPM *in vitro* (Komisarczuk *et al.*, 1987). Las necesidades de P para la síntesis de proteína microbiana se estiman en 4.3 g P disponible/kg MOF o de 7.7 g P/kg MOF en el rumen para asegurar una degradación óptima de la celulosa (Broudiscou y Jouany, 1995).

El Mg es otro mineral considerado esencial para los microorganismos ruminales, ya que forma parte de numerosos enzimas (Mackie y White, 1990). La disponibilidad del Mg puede verse reducida en condiciones que favorecen un pH ruminal alto, concentraciones elevadas de amoníaco y de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) o cuando se une con los ácidos orgánicos de las plantas (Broudiscou y Jouany, 1995). Según Durand y Komisarczuk (1988, citado Broudiscou y Jouany, 1995), debería asegurarse un aporte mínimo de 2.3 a 3.8 g Mg/kg MOF en el rumen.

Aún cuando la falta de estos compuestos (minerales, vitaminas, AGV-R) pueden limitar el crecimiento microbiano, el aporte de los mismos bajo condiciones normales de alimentación no suele ser limitante, ya que están presentes en los alimentos en cantidades suficientes (Demeyer, 1991).

La inclusión de ionóforos en la dieta de rumiantes (p. e. monensina) se ha propuesto como una alternativa que permite reducir la desaminación y la acumulación de amoníaco en el rumen (Dinius *et al.*, 1976) y en el CNCPS (Russell *et al.*, 1992) se considera que puede afectar el metabolismo del N al considerar que su inclusión puede disminuir la utilización de péptidos por las NSCBact en un 34%. A pesar de ello, no se ha podido determinar con exactitud los efectos de la inclusión de monensina ú otros ionóforos en la dieta sobre la síntesis y/o ESPM. Algunos resultados obtenidos *in vitro* sugieren una mejora en la síntesis y/o ESPM (Jalc *et al.*, 1992; Yang y Russell, 1993; Jalc y Laukova, 2002). Por el contrario, otros experimentos realizados *in vitro* (Wallace *et al.*, 1981; Han *et al.*, 2002) o *in vivo* (Muntifering *et al.*, 1981; Haïmoud *et al.*, 1996)



no evidenciaron un efecto positivo de los antibióticos ionóforos sobre la síntesis y/o ESPM.

Se ha sugerido que el uso de otros aditivos, entre ellos los probióticos, en dietas para rumiantes (p.e. *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae*), pueden ejercer un efecto positivo sobre la síntesis de proteína microbiana, al estimular el crecimiento y la viabilidad bacteriana (Wallace, 1992, 1994). Actualmente, el efecto beneficioso de los probióticos sobre el crecimiento bacteriano se atribuye a la eliminación de oxígeno del medio ruminal, que se traduce en una mayor estabilidad del pH, y un estímulo al crecimiento de bacterias celulolíticas y la síntesis de proteína microbiana (Broderick *et al.*, 1991; Wallace, 1992, 1994).

También la inclusión en la dieta de ácidos orgánicos (p.e malato, aspartato y fumarato; Martin, 1998) y de aceites esenciales extraídos de semillas (p.e. colza, girasol, linaza, etc.; Jalc *et al.*, 2002) pueden tener un efecto positivo sobre la síntesis de proteína microbiana, a través de una mejora en las condiciones de fermentación en el rumen.

### **3.5.2. Factores relacionados con cambios físicos del medio ruminal.**

#### **3.5.2.1. Efectos del pH ruminal.**

El pH del rumen es un parámetro físico-químico esencial en la digestión y la nutrición del rumiante (Sauvant *et al.*, 1999, de Veth y Kolver, 2001a). El pH se considera un componente importante en los modelos de utilización de nutrientes tales como el CNCPS (Pitt *et al.*, 1996) y en el modelo desarrollado por Dijkstra *et al.* (1992).

El pH ruminal puede variar en un rango entre 5.0 y 7.2, dependiendo del tipo de dieta y el manejo alimentario (Owen y Goetsch, 1988). Sin embargo, no existe consenso entre investigadores a la hora de asignar un valor único de pH donde se optimiza el funcionamiento ruminal, aunque el rango es relativamente estrecho (Hoover *et al.*, 1984; Shriver *et al.*, 1986; Pitt *et al.*, 1996; Russell,

1998b; Sauvant *et al.*, 1999; Cardozo *et al.*, 2001; de Veth y Kolver, 2001a; Calsamiglia *et al.*, 2002). Un pH ruminal bajo se asocia con una serie de desórdenes de tipo nutritivo y patológicos (Sauvant *et al.*, 1999). La disminución del pH está asociada, en general, con la ingestión de elevadas cantidades de almidón u otras fuentes de carbohidratos rápidamente fermentables por parte del animal, y el consumo limitado de forrajes (Slyter, 1976; Owen *et al.*, 1998), y ocurre, principalmente, como consecuencia de la acumulación de AGV y ácido láctico (Slyter, 1976; Goad *et al.*, 1998; Owen *et al.*, 1998).

La acidosis ruminal afecta negativamente al metabolismo del rumen y del animal (Slyter, 1976; Owen *et al.*, 1998; Sauvant *et al.*, 1999). La reducción del pH ruminal afecta al ritmo de crecimiento microbiano (Russell *et al.*, 1979; Hoover *et al.*, 1984; Hoover, 1986), a la digestión de carbohidratos (Mould *et al.*, 1983; Shriver *et al.*, 1986) y a la producción y proporción de AGV (Erflé *et al.*, 1982; Mould *et al.*, 1983; Hoover, 1986; Russell, 1998b).

La primera alteración evidente derivada de la disminución del pH ruminal cuando se incluyen grandes cantidades de carbohidratos rápidamente fermentables (superiores al 30% de la ingestión de materia seca) es la reducción en la digestión de la fibra en el rumen (Hoover, 1986). Entre las teorías que tratan de explicar esta menor digestión de la fibra se incluyen:

- i) Preferencia de los microorganismos del rumen por los carbohidratos fácilmente fermentables o competición entre microorganismos celulolíticos y amilolíticos por nutrientes esenciales, y que favorecen la proliferación de los microorganismos que digieren carbohidratos rápidamente fermentables (Hoover, 1986);
- ii) Reducción en la capacidad de adhesión de las bacterias a la fibra (Smith *et al.*, 1973; Cheng *et al.*, 1980; Shriver *et al.*, 1986);
- iii) Enlentecimiento de la velocidad de replicación y reducción en el número de microorganismos celulolíticos a pH bajo, debido a que se incrementan los costes de mantenimiento de las bacterias. Es decir, se produce un mayor gasto energético para mantener la fuerza motriz de

los protones a través de la membrana bajo esas condiciones de pH (Russell y Dombroski, 1980).

Existe suficiente evidencia que indica que las principales especies de bacterias celulolíticas (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*) no toleran los niveles de pH ruminal bajos derivadas de las prácticas modernas de alimentación del ganado vacuno (Russell y Dombroski, 1980; Russell y Wilson, 1996; Russell, 1998b). Sin embargo, parece ser que no es el valor de pH en sí, sino el tiempo durante el cual el pH ruminal permanece por debajo del valor crítico, lo que provoca el efecto inhibitorio. Si la disminución del pH ruminal (rango de valores 5.8 a 6.2) es cíclico y de corta duración, el impacto sobre la digestión de la fibra y el crecimiento de la población microbiana se considera de poca magnitud (Mould y Ørskov, 1984; Hoover, 1986; Hoover y Miller, 1992). Estos hallazgos han sido confirmados en experimentos recientes realizados en fermentadores continuos de flujo doble (de Veth y Kolver, 2001b; Calsamiglia *et al.*, 2002). La reducción del pH por debajo de 5.5 se traduce por lo general en una severa depresión de la digestión de la fibra (Hoover *et al.*, 1984; Cardozo *et al.*, 2001), aunque la severidad del efecto depende de la fuente de fibra utilizada en la dieta (de Veth y Kolver, 2001a, b).

La evaluación *in vivo* del efecto que la reducción del pH ejerce sobre la síntesis de proteína y la ESPM no es fácil, ya que el efecto del sustrato de fermentación se confunde con el efecto directo del pH. Por esa razón, la mayoría de resultados obtenidos hasta el presente derivan de experimentos realizados *in vitro* con cultivos puros o en sistemas de cultivo continuo. Los resultados obtenidos parecen indicar que la ESPM resulta poco afectada por la disminución del pH ruminal. Hoover y Miller (1992), tomando como base los datos obtenidos *in vitro* por varios autores (Figura 4), concluyeron que la ESPM disminuye sólo cuando el pH del medio es inferior a 5.5. Resultados más recientes parecen corroboran dichas observaciones. De Veth y Kolver (2001a), en un experimento realizado con fermentadores, observaron una respuesta cuadrática ( $P = 0.054$ ) en la ESPM a la reducción del pH ruminal, cuyos valores fueron de 17.5, 18.6, 20.1 y 17.7 g N/kg MOVD para los valores de pH de 6.6, 6.2, 5.8 y 5.4,

respectivamente, con un valor óptimo a pH 5.95. Otros resultados obtenidos también en fermentadores (Cardozo *et al.*, 2001) no observaron diferencias en la ESPM cuando el pH del medio varió en un rango de entre 4.9 y 7.0 (intervalos de 0.3), o cuando el valor de pH se mantuvo alto (6.4), bajo (5.7) o con fluctuaciones alternadas en el pH (entre pH 6.4 y 5.7; Calsamiglia *et al.*, 2002).

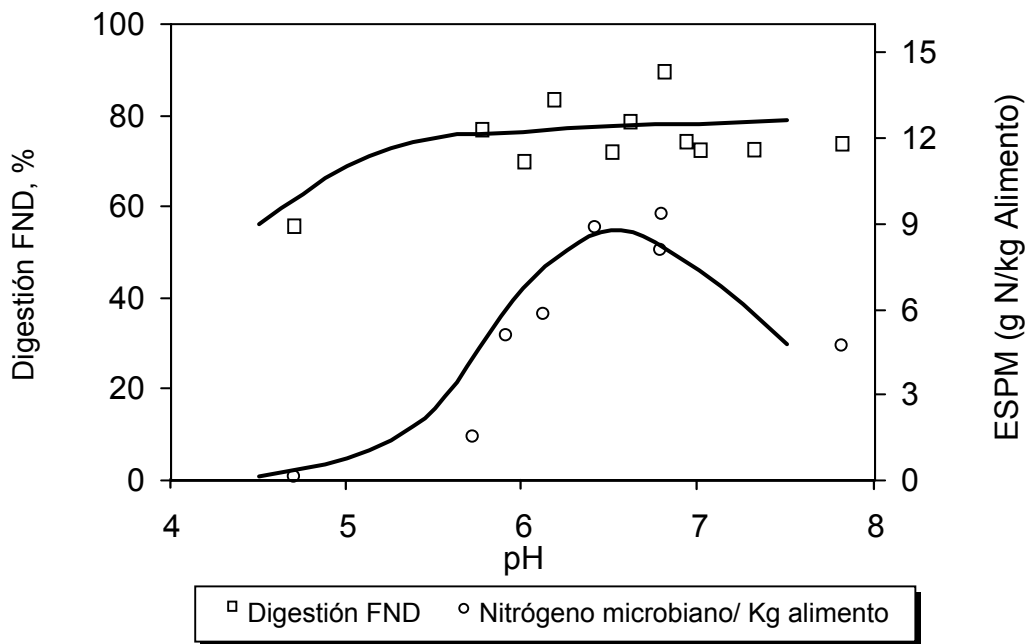


Figura 4. Efecto del pH sobre la digestión de FND y nitrógeno microbiano producido por kg de alimento suministrado a los fermentadores (Tomado de Hoover y Miller, 1992).

La respuesta observada en la síntesis de proteína microbiana (g N/d) a los cambios en el pH resulta inconsistente entre experimentos, por lo que es difícil establecer un valor óptimo de pH necesario para maximizar la síntesis de proteína bacteriana. Resultados obtenidos *in vitro* por Strobel y Russell (1986), quienes utilizaron bacterias aisladas del rumen e incubadas en un medio artificial a pH 6.7 y 6.0, y suministraron distintas fuentes de carbohidratos (almidón, sucrosa, celobiosa, xylano, pectina o una mezcla de carbohidratos), observaron una reducción media del 45% (rango 34 a 69%) en la síntesis de proteína microbiana (84.1 vs 152.3 mg/L proteína microbiana) cuando el pH del medio fue

6.0 comparado con el pH 6.7. De Veth y Kolver (2001a), en un experimento realizado en fermentadores continuos de flujo doble, también observaron menor síntesis de proteína microbiana (g N/d) a pH 5.4 (0.54) comparado con pH superiores (0.71, pH 5.8; 0.69, pH 6.2; y 0.66, pH 6.6), estableciendo como óptimo un valor de pH de 6.13. Los resultados de otro experimento realizado con fermentadores (Cardozo *et al.*, 2001) señalan que la mayor síntesis de proteína microbiana (g N/d) se produce cuando el rango de pH está comprendido entre 5.8 y 6.7. Cuando los valores de pH están por encima o por debajo de dicho rango, la síntesis de proteína microbiana disminuyó. La disminución de la síntesis de proteína microbiana sin modificar la ESPM es posible debido a la menor digestibilidad de la ración y la consiguiente disminución de la disponibilidad de energía para los microorganismos ruminales a pH bajos.

Generalmente, el tiempo durante el cual prevalecen las condiciones de pH bajo en el rumen no es constante, sino que se suceden fluctuaciones en el tiempo (durante el día y entre días) en función del tipo de dieta, la frecuencia y el nivel de ingestión, etc. Dichas fluctuaciones pueden afectar a la síntesis de proteína de origen microbiano. Sin embargo, la información disponible acerca del efecto de las fluctuaciones del pH es escasa e inconsistente, y proviene generalmente de experimentos *in vitro*, dada las dificultades para evaluar este factor *in vivo*. De Veth y Kolver (2001b) evaluaron el efecto de reducir el pH de 6.3 a 5.4 durante 4, 8 y 12 h utilizando fermentadores continuos de flujo doble. Los resultados indicaron una reducción lineal en la síntesis de proteína microbiana (g N/d) a medida que se incrementó el tiempo de exposición a pH bajo. La reducción fue de un 25% cuando el tiempo de exposición a las condiciones de pH bajo (5.4) fue de 12 h comparado con el tratamiento control (pH 6.3). Por el contrario, Calsamiglia *et al.* (2002), en un experimento similar realizado también con fermentadores, no observaron diferencias significativas en la síntesis de proteína microbiana debidas a la reducción del pH de 6.4 a 5.7 (1.20 vs 1.21, 1.33 gN bacteriano/d) o sus fluctuaciones a lo largo del día (1.33, 1.14 gN bacteriano/d, respectivamente).

### 3.5.2.2. Efecto de la tasa de dilución.

Modificaciones en el ritmo de renovación de las fracciones líquida y sólida del contenido ruminal pueden ejercer un efecto marcado en la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano (Isaacson *et al.*, 1975; Russell *et al.*, 1992). Al igual que para el pH, es difícil evaluar el efecto de estos factores en condiciones de experimentación *in vivo*, por lo que los resultados provienen fundamentalmente de estudios realizados *in vitro*.

En general, los estudios realizados *in vitro* con cultivos puros o mezcla de bacterias ruminales, o aquellos realizados en sistemas de cultivo continuo, indican una mayor síntesis y eficiencia de síntesis de proteína microbiana con el incremento en la tasa de dilución de la fase líquida (Figura 5a, Isaacson *et al.*, 1975; Meng *et al.*, 1999), de la fase sólida (Figura 5b, Hoover *et al.*, 1982; Schadt *et al.*, 1999) o de ambas (Figura 5c, Crawford *et al.*, 1980b; Shriver *et al.*, 1986).

Una mayor síntesis y/o ESPM obtenidas con elevadas tasas de dilución de líquidos puede explicarse por las siguientes razones (Isaacson *et al.*, 1975; Hespell y Bryant, 1979; Meng *et al.*, 1999):

- i) La selección de especies microbianas con mayor velocidad de crecimiento;
- ii) La proporción de la población microbiana que se encuentra en la fase exponencial de crecimiento es mayor, con lo cual se reducen las necesidades de nutrientes para las funciones de mantenimiento;
- iii) La reducción en la población de protozoos, y con ello la predación de bacterias.

El incremento de la tasa de dilución de líquidos en el rumen beneficia a la población bacteriana de crecimiento rápido, con lo cual una menor proporción de la energía disponible se utiliza para el mantenimiento. Además, tasas de dilución de líquidos altas se asocian con un menor tiempo de retención en el rumen, lo que reduce la lisis celular y la predación de bacterias por parte de los protozoos.

La tasa de dilución lenta favorece la predación de bacterias por parte de los protozoos, lo que provoca a la vez, una reducción en el flujo de proteína microbiana que sale del rumen con respecto a la cantidad de proteína microbiana sintetizada (Stern y Hoover, 1979; Hoover y Miller, 1992; Firkins, 1996).

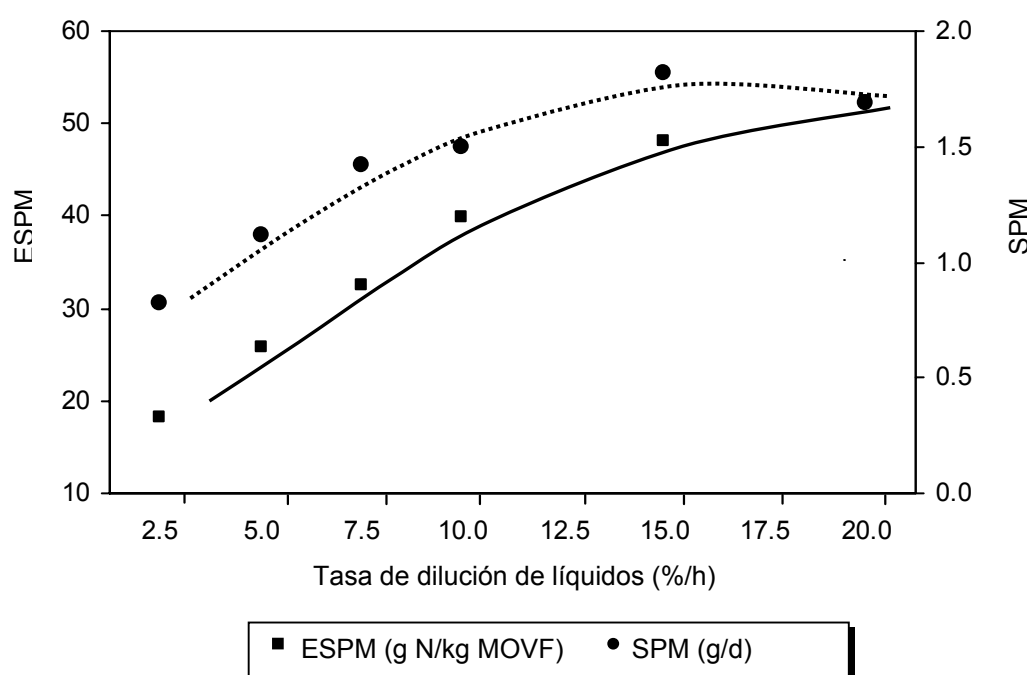


Figura 5a. Efecto de la tasa de dilución de líquidos sobre la síntesis (SPM) y la ESPM (Meng *et al.*, 1999).

Dada la correlación positiva observada entre la tasa de dilución de líquidos y la ESPM *in vitro*, se asumió inicialmente que *in vivo* ocurriría algo similar. Sin embargo, con los resultados obtenidos *in vivo* no ha sido posible corroborar tales premisas, ya que la ESPM no siempre está directamente relacionada con la tasa de dilución de líquidos, y ocasionalmente la respuesta obtenida es contraria a la esperada (Sniffen y Robinson, 1987; Owen y Goetsch, 1988). En algunos casos (Zinn y Owens, 1983; Robinson *et al.*, 1985) se observó una mayor ESPM con el incremento en la tasa de dilución de líquidos, mientras que en otros casos

(Chamberlain y Thomas, 1980; Merchen *et al.*, 1986; Firkins *et al.*, 1987) no se pudo demostrar este efecto positivo.

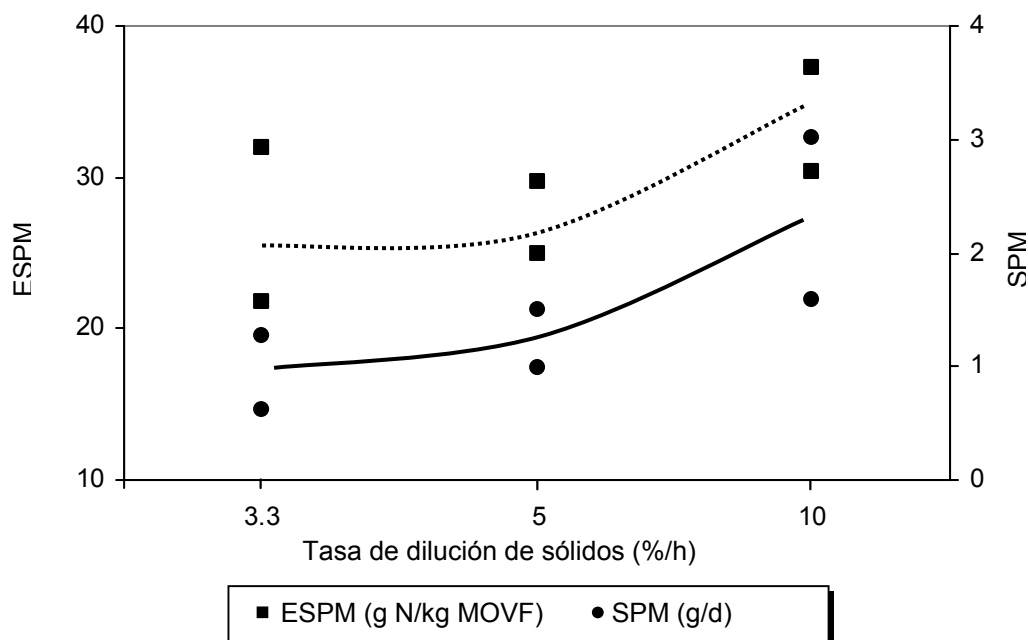


Figura 5b. Efecto de la tasa de dilución de sólidos sobre la síntesis (SPM) y la ESPM (Schadt *et al.*, 1999).

La aparente contradicción entre experimentos *in vivo* e *in vitro* puede ser debida a que es difícil modificar el ritmo de paso sin provocar cambios simultáneos en el aporte y naturaleza del substrato fermentable o las condiciones de fermentación en el rumen, lo cual produce efectos confundidos. Además, las diferencias observada entre experimentos *in vivo* e *in vitro* puede estar relacionada con la compleja compartimentación que ocurren en el rumen, donde substratos y compartimentos están sometidos a un continuo proceso de cambio, y donde no todos sus compartimentos tienen las mismas tasas de dilución (Cotta y Hespell, 1986; Demeyer, 1991).

La tasa de dilución de las fracciones líquida y sólida del contenido ruminal difieren según el nivel de ingestión (Merchen *et al.*, 1986; Faichney, 1993; Archimede *et al.*, 1997), la proporción de forraje en la dieta (Rode y Satter, 1988), el tamaño de partículas de la ración (Uden 1988; Woodford y Murphy,



1988), la temperatura ambiental (Kennedy *et al.*, 1976; Kennedy y Milligan, 1978), y el aporte de sales minerales (Harrison *et al.*, 1975), entre otras. Las diferentes especies de microorganismos presentes en el rumen se asocian a diferentes fases y, por lo tanto a diferentes cinéticas de tránsito, con lo cual la cantidad de proteína microbiana sintetizada o la eficiencia de dicho proceso pueden cambiar dependiendo del tipo de población microbiana y las condiciones del medio ruminal.

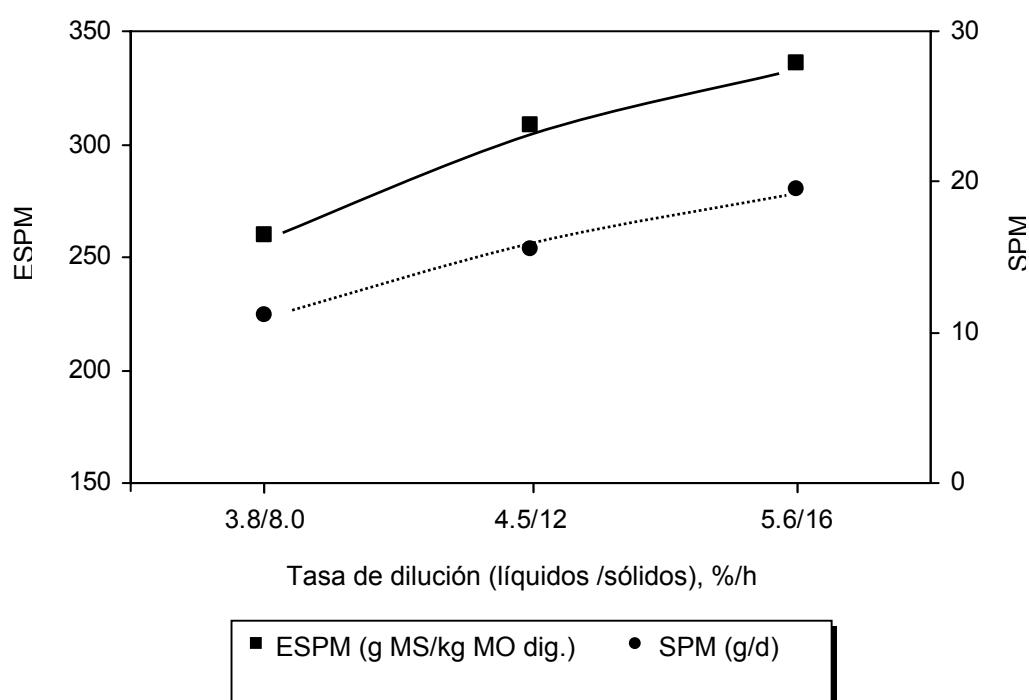


Figura 5c. Efecto de los cambios en el flujo de sólidos y líquidos sobre la síntesis (SPM) y ESPM en cultivo continuo (Shriver *et al.*, 1986).

Partiendo del hecho que las bacterias están más estrechamente asociadas con las partículas de alimento (Cheng *et al.*, 1977; Akin, 1979; Craig *et al.*, 1987; Olubobokun *et al.*, 1988), se esperaría que el flujo de proteína bacteriana y la ESPM estuviesen relacionadas más con la tasa de dilución de sólidos que con la de líquidos (Crawford *et al.*, 1980a). Los resultados de varios experimentos realizados *in vitro* con fermentadores coinciden al señalar una mayor ESPM con el incremento en la tasa de dilución de sólidos (Crawford *et al.*, 1980b; Hoover *et*

*al.*, 1982; Schadt *et al.*, 1999). El flujo de proteína de origen bacteriano, por lo general, también es mayor a medida que se incrementa la tasa de dilución de sólidos (Figura 5b, Crawford *et al.*, 1980a; Schadt *et al.*, 1999), aunque en otros casos no se han observado aumentos significativos con el incremento en la tasa de dilución de sólidos (Hoover *et al.*, 1982). Crawford *et al.* (1980b) argumentaron que la mayor ESPM observada con el incremento en la tasa de dilución de sólidos se justifica por las mismas razones que explican el incremento con una mayor tasa de dilución de líquidos en sistemas de cultivo de flujo simple (Isaacson *et al.*, 1975), y que fueron señaladas anteriormente.

#### **4. Composición de la proteína microbiana**

##### **4.1. Importancia de la proteína microbiana para el rumiante.**

El valor nutritivo de la proteína microbiana como fuente de aminoácidos para el rumiante no tiene discusión. Se estima que la proteína de origen microbiano cubre entre un 50 y un 80% de las necesidades de proteína absorbible del vacuno lechero (Storm y Ørskov, 1983, 1984; Klusmeyer *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1992; Stern *et al.*, 1994; Schwab, 1996; Dijkstra *et al.*, 1998). Además, tiene un valor biológico alto y consistente, con una elevada digestibilidad intestinal (Stern *et al.*, 1994; Hoover y Miller, 1996) y un alto contenido en AA esenciales (AAE, Czerkawski, 1976), cuyo perfil es similar al de la proteína de la leche y al tejido muscular (Storm y Ørskov, 1984; Clark *et al.*, 1992; Schingoethe, 1996; Schwab, 1996, Tabla 4).

Con el objetivo de aprovechar el elevado valor biológico de la proteína microbiana, es importante maximizar la síntesis y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana en el rumen (Stern *et al.*, 1994). Se considera que mejorar la eficiencia podría ser beneficioso para incrementar el aporte de AAE a un costo relativamente menor que aumentando los aportes de suplementos proteicos en la dieta (Mabjeesh *et al.*, 1997).

Tabla 4. Comparación del perfil de aminoácidos de bacterias ruminales, músculo y leche<sup>1</sup>.

Item	Arg	Thr	Val	Met	Leu	Ile	Phe	Lys	His	Trp
----- % de AAE Totales -----										
Bacteria	10.4	11.3	12.3	5.0	15.9	11.5	10.1	16.5	4.1	2.6
Músculo	16.8	9.9	10.1	5.1	17.0	7.1	8.9	16.3	6.3	2.5
Leche	7.2	8.9	13.0	5.5	19.5	11.4	10.0	16.0	5.5	3.0

<sup>1</sup>: Modificado de NRC (2001).

#### 4.2. Composición química de la proteína microbiana.

La calidad de la proteína microbiana, medida en términos de composición química (Tabla 5) y perfil de AA (Tabla 6), resulta muy variable.

La información contenida en dichas tablas procede de la recopilación bibliográfica hecha por Clark *et al.* (1992), donde resulta evidente la gran amplitud en el rango de valores señalados para el contenido de MO, N, DAPA, bases púricas, relación marcador microbiano:nitrógeno, contenido de N aminoacídico y perfil de AA en las bacterias ruminales. Resultados experimentales posteriores coinciden con las observaciones de Clark *et al.* (1992), al señalar diferencias importantes en la composición química de las muestras bacterianas (Martin *et al.*, 1994, 1996; Pérez *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001).

Los sistemas actuales de formulación proteica para el vacuno lechero consideran la importancia de la composición en AA de la proteína que fluye al intestino delgado del rumiante, e incluyen los aportes de proteína en términos de aminoácidos microbianos en sus modelos de predicción (O'Connor *et al.*, 1993; Rulquin y Vérité, 1993; Lescoat y Sauvant, 1995; NRC, 2001). Sin embargo, en dichos sistemas se asume que el perfil de AA de la proteína microbiana es constante, a pesar de que existe evidencia que indica lo contrario. Tomando como ejemplo los datos de la recopilación bibliográfica de Clark *et al.* (1992,

Tabla 6), se puede observar que el perfil de AA de las bacterias varía ampliamente, destacándose el elevado coeficiente de variación en el contenido de ciertos AA esenciales como Arg (13.2%), His (21.3%), Leu (10.3%), Lys (11.9) y Met (25.6%). Al formular una ración basado en las necesidades de AA para el vacuno lechero, el hecho de utilizar el valor mínimo o el valor máximo del rango puede representar la diferencia en la toma de decisión entre incluir o no un aporte suplementario de un determinado AA esencial.

Tabla 5. Composición química de las bacterias ruminales<sup>1</sup>

Variable <sup>2</sup>	N <sup>3</sup>	Media	Mínimo	Máximo	DE <sup>4</sup>	CV <sup>5</sup> (%)
MO, % MS	73	77.50	60.80	92.20	7.60	9.8
N, % MS	87	7.71	4.83	10.58	1.19	15.4
N, % MO	71	9.96	7.35	13.23	1.22	12.2
Purinas, % MS	45	7.28	2.40	13.02	2.24	30.8
DAPA, % MS	20	0.31	0.14	0.44	0.09	29.2
N:Purinas	50	1.06	0.61	2.13	0.31	29.8
N:DAPA	20	27.64	21.10	44.19	5.53	20.0
AA-N, % N Total	34	66.50	54.90	86.70	8.90	13.5

<sup>1</sup> Clark *et al.* (1992).

<sup>2</sup> MO= Materia orgánica; MS= Materia seca; N=nitrógeno; DAPA=Ácido diaminopimélico; AA-N= N aminoacídico.

<sup>3</sup> n= número de observaciones.

<sup>4</sup> DE= Desviación estándar.

<sup>5</sup> CV= Coeficiente de variación.

#### 4.2.1. Factores de variación de la composición química de la proteína microbiana

Dada la complejidad del ecosistema ruminal, es lógico pensar que las diferencias observadas en la composición química de la proteína microbiana sean consecuencia del efecto de un gran número de factores, entre los que se incluyen las técnicas de aislamiento microbiano, el tipo de población considerada, el tipo de ración y las pautas de alimentación, etc.

Tabla 6. Perfil de aminoácidos de las bacterias ruminales<sup>1</sup>

Aminoácidos	Media	Mínimo	Máximo	DE <sup>2</sup>	CV <sup>3</sup> (%)
Arginina	5.1	3.8	6.8	0.7	13.2
Histidina	2.0	1.2	3.6	0.4	21.3
Isoleucina	5.7	4.6	6.7	0.4	7.4
Leucina	8.1	5.3	9.7	0.8	10.3
Lisina	7.9	4.9	9.5	0.9	11.9
Metionina	2.6	1.1	4.9	0.7	25.6
Fenilalanina	5.1	4.4	6.3	0.3	6.4
Treonina	5.8	5.0	7.8	0.5	8.9
Valina	6.2	4.7	7.6	0.6	10.1
Alanina	7.5	5.0	8.6	0.6	7.3
Ácido aspártico	12.2	10.9	13.5	0.6	4.8
Ácido glutámico	13.1	11.6	14.4	0.7	5.3
Glicina	5.8	5.0	7.6	0.5	8.2
Prolina	3.7	2.4	5.3	0.5	13.2
Serina	4.6	3.4	5.4	0.4	8.9
Tirosina	4.9	3.9	7.7	0.6	13.2

<sup>1</sup> Clark *et al.* (1992).

<sup>2</sup> DE= Desviación estándar; <sup>3</sup>CV= Coeficiente de variación.

#### 4.2.1.1. Diferencias relacionadas con las técnicas utilizadas en el aislamiento microbiano

Clark *et al.* (1992) sugirieron que parte de las diferencias en la composición química de las bacterias ruminales podrían atribuirse a la diversidad de técnicas utilizadas por los distintos laboratorios para su aislamiento y posterior análisis. Los distintos procedimientos empleados en la obtención de los aislados microbianos (velocidad de centrifugación y filtración, métodos de desligamiento, etc.), pueden favorecer la selección y el aislamiento de grupos bacterianos específicos (Ørskov, 1988), y con ello provocar cambios en su composición.

De forma convencional, las muestras bacterianas se obtienen de la fracción líquida del contenido ruminal mediante centrifugación diferencial, debido a la sencillez del método. Este método consiste en una primera centrifugación (a baja velocidad) del filtrado obtenido una vez extraído el líquido ruminal. Con esta primera centrifugación precipitan las partículas de pequeño tamaño que contiene restos de alimento y protozoos. Posteriormente se realiza una segunda centrifugación del sobrenadante a alta velocidad con el fin de precipitar las bacterias que se encuentran en suspensión. El rango de velocidades de centrifugación utilizados para la precipitación de las bacterias es muy amplio, encontrándose en la bibliografía valores para la centrifugación lenta que oscilan entre las 200 x g durante 5 minutos (Smith y McAllan, 1974) hasta 1,200 x g durante 4 minutos (Storm y Orskov, 1983). Para la centrifugación rápida o segunda centrifugación, las velocidades oscilan entre las 8,000 x g durante 20 minutos (Cecava *et al.*, 1990b) hasta las 27,000 x g durante 40 minutos (Legay-Carmier y Bauchart, 1989).

A pesar del amplio rango de velocidades de centrifugación utilizados, la variación en la composición química de las bacterias aisladas es pequeña. Hsu y Fahey (1990) no observaron diferencias importantes en la composición química de las bacterias obtenidas a diferentes velocidades de centrifugación (4,640; 9,820 y 25,900 x g), al igual que Pérez (1996), quién tampoco observó diferencias en la composición química de extractos bacterianos obtenidos de la fracción líquida a velocidades de centrifugación entre 7,000 y 20,000 x g.

En algunos casos, los aislados bacterianos se obtienen a partir de las fracciones líquida y sólida del contenido ruminal, pudiéndose obtener muestras bacterianas que incluyen una mezcla de bacterias de las fracciones líquidas y sólidas, o aislar ambas fracciones por separado. Sin embargo, la población asociada con la fracción sólida se encuentra adherida a las partículas. Por lo tanto, para su aislamiento es necesario el uso de diversos métodos de desligamiento (físicos: agitación, homogenización, ...; químicos: alcohol, formaldehído, ácidos, etc., o combinaciones de ambos), que pueden alterar la integridad celular y con ello provocar cambios en la composición química del

aislado bacteriano (Cecava *et al.*, 1990b). De hecho, los resultados obtenidos por Whitehouse *et al.* (1992) indican diferencias en la composición química de las muestras microbianas (proteína bruta, lípidos totales, contenido en bases púricas y relación bases púricas:N) debidas a la utilización de distintos métodos de desligamiento.

Aunque parte de la variación referida en los artículos de revisión bibliográfica puede ser debida a diferencias relacionadas con las distintas metodologías utilizadas en el aislamiento bacteriano, Clark *et al.* (1992) indicaron que al restringir los datos de composición bacteriana a aquellos obtenidos en un mismo laboratorio, utilizando las mismas técnicas para el aislamiento y determinación de la composición bacteriana, se redujo considerablemente el coeficiente de variación, pero no la existencia de diferencias en composición química de las bacterias. Es decir, existen otros factores además de las técnicas de aislamiento y análisis químico, que son responsables de provocar cambios en la composición química de las bacterias.

#### **4.2.1.2. Diferencias relacionadas con el tipo de población microbiana utilizada.**

Los datos bibliográficos disponibles indican la existencia de diferencias en la composición química entre bacterias y protozoos, y entre bacterias asociadas con las fracciones líquida (BL) y sólida (BS) del contenido ruminal (Tabla 7). Las diferencias entre bacterias y protozoos pueden considerarse de poca trascendencia, ya que los protozoos contribuyen poco al flujo total de proteína microbiana que llega al intestino delgado del rumiante (Weller y Pilgrim, 1974; Hino y Russell, 1987). Sin embargo, las diferencias evidentes en la composición química entre BL y BS no deberían obviarse, ya que la contribución de cada una de estas fracciones al flujo total de proteína al intestino delgado es importante (Craig *et al.*, 1987; Olubobokun *et al.*, 1988), y puede afectar a la contribución al flujo total de proteína microbiana.

Tabla 7. Composición química de distintas poblaciones microbianas del rumen.

Item	Población microbiana				Referencia
	Protozoos	Bacterias	BL	BS	
MO, % MS	--	--	84.9	87.2	Craig <i>et al.</i> (1987)
Ácidos nucleicos:N	--	--	0.98	0.92	
MO, % MS	81.2	83.7	80.1	87.2	Olubobokun <i>et al.</i> (1988)
PB, % MS	49.8	59.9	62.8	57.0	
DAPA, mg/gN	25.2	34.8	38.0	31.6	
DAPA, mg/gMS	1.59	2.75	3.00	2.50	
MO, % MS	--	--	75.1	82.3	Legay-Carmier y Bauchart, (1989)
PB, % MS	--	--	42.8	37.8	
DAPA, mg/gMS	--	--	2.25	1.36	
PB, % MO	--	--	55.3	45.4	Olubobokun y Craig, (1990)
DAPA, mg/gN	--	--	24.7	24.3	
DAPA, mg/gMS	--	--	1.90	1.58	
MO, % MS	89.5	--	62.5	77.7	Martin <i>et al.</i> (1994)
PB, % MO	31.9	--	55.0	49.7	
DAPA, % N	0	--	2.25	1.16	
<sup>15</sup> N, % N	0.09	--	0.164	0.111	
MO, % MS	--	--	67.9	71.9	Pérez <i>et al.</i> (1998)
PB, % MO	--	--	53.0	52.9	
BP, µmol/g MO	--	--	160.3	148.9	
BP:N, µmol/mg	--	--	1.89	1.66	
MO, % MS	--	--	73.1	80.2	Rodríguez <i>et al.</i> (2000)
PB, % MS	--	--	43.9	44.9	
BP, µmol/g N	--	--	860	602	
<sup>15</sup> N: N, % átomos	--	--	0.517	0.486	
MO, % MS	--	--	62.4	73.8	Yang <i>et al.</i> (2001)
PB, % MS	--	--	58.4	56.6	
<sup>15</sup> N, mg/kg MO	--	--	37.3	30.3	
<sup>15</sup> N, % N	--	--	0.040	0.033	



Tomando como referencia los datos de la Tabla 7, puede observarse que, independientemente de las diferencias en los valores absolutos para cada una de las variables, la composición química de BL y BS difiere entre sí. Por ejemplo, las bacterias obtenidas de la fracción líquida se caracterizan por tener un menor contenido en MO, y un mayor contenido de proteína (con excepción de los datos de Martin *et al.*, 1994 y Rodríguez *et al.*, 2000), de marcador microbiano, y de la relación marcador microbiano:nitrógeno, comparado con las bacterias obtenidas de la fracción sólida.

El menor contenido de MO presente en los extractos bacterianos obtenidos de la fracción líquida comparado con los extractos aislados de la fracción sólida, puede estar relacionado con un mayor contenido de cenizas en BL (Craig *et al.*, 1987; Olubobokun *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1998), o con un mayor contenido de lípidos en BS (Merry y McAllan, 1983; Martin *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 2000). Las variaciones en el contenido de cenizas han sido relacionadas con la diferente capacidad que tienen BL y BS para captar las sales provenientes de las soluciones salinas utilizadas durante el proceso de aislamiento y lavado de los extractos bacterianos (Martin *et al.*, 1994). Por el contrario, la teoría que relaciona las diferencias en el contenido de MO con un mayor contenido de lípidos en BS, se basa en que una mayor concentración de lípidos o precursores de lípidos (ácidos grasos, acetato) en el micro ambiente de BS puede favorecer el incremento en la síntesis y/o adsorción, por parte de la células bacterianas, de los ácidos grasos provenientes de la dieta (Harfoot, 1981).

No existe consenso entre autores sobre la existencia o no de diferencias en el contenido de proteína (N x 6.25) entre BL y BS (Tabla 7). En algunos casos, los resultados obtenidos no indican diferencias significativas entre ambas fracciones bacterianas (Bauchart *et al.*, 1986; Craig *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 2000). Otros señalan un mayor contenido de N en BS (Merry y McAllan, 1983; Komisarczuk *et al.*, 1987), o en BL (Firkins *et al.*, 1987; Benchaar *et al.*, 1995). En los casos donde se observaron diferencias en el contenido de N entre los grupos microbianos, los autores señalan que éstas pueden reflejar diferencias en

el estado de crecimiento, o en la cantidad de polisacáridos almacenados por las bacterias libres respecto a las adheridas a las partículas (Cecava *et al.*, 1990b; Pérez, 1996).

También es necesario resaltar las diferencias entre BL y BS en cuanto al contenido de marcador microbiano y a la relación marcador microbiano:N, cuyos valores son más elevados en BL comparado con BS (Tabla 7). Estas diferencias, al igual que en el caso del contenido de N, pueden asociarse con diferencias en las especies bacterianas presentes en cada una de las fracciones, la velocidad de síntesis de proteína microbiana o el mayor ritmo específico de crecimiento en BL que en BS (Legay-Carmier y Bauchart, 1989; Martin *et al.*, 1994; Pérez, 1996).

La relación marcador microbiano:N es un parámetro fundamental en la estimación de la síntesis y/o ESPM. Por lo tanto, diferencias entre BL y BS en dicha relación, hace que las estimaciones de síntesis y/o ESPM obtenidas a partir de diversos marcadores microbianos puedan variar considerablemente (Pérez *et al.*, 1998). Para ilustrar el efecto que las diferencias en la relación marcador microbiano:N entre ambos grupos bacterianos pueden tener en la estimación de la síntesis (flujo de N microbiano, g/d) y la ESPM (g N bacteriano/kg MOVF), se utilizará un ejemplo donde todas las variables utilizadas en el cálculo, excepto la relación marcador microbiano:N, permanecen constantes. Los valores utilizados se tomaron de un experimento realizado con fermentadores (Calsamiglia *et al.*, 2002): Flujo de N Total (g/d) = 3.3; Relación marcador microbiano:N en el efluente = 10:1; kg MOVF = 52. La relación marcador microbiano:N en las bacterias se fijó en 25:1 para BL y, tomando en cuenta los valores de la Tabla 7, se puede observar que en promedio la relación marcador microbiano:N es un 20% menor en BS, por lo tanto para esta población la relación utilizada en el cálculo fue de 20:1. Al realizar los cálculos se obtuvo:

$$\text{Síntesis}_{\text{BL}} = 1.32 \text{ g N/d};$$

$$\text{Síntesis}_{\text{BS}} = 1.65 \text{ g N/d}$$

$$\text{ESPM}_{\text{BL}} = 25.4 \text{ g N/kg MOVF};$$

$$\text{ESPM}_{\text{BS}} = 31.7 \text{ g N/kg MOVF}$$

De estos cálculos se deduce que no considerar las diferencias en la relación marcador microbiano:N entre ambas poblaciones conduce a la estimación incorrecta de la síntesis de proteína microbiana y la ESPM. Lo recomendable sería en cualquier caso, considerar la contribución relativa de ambas poblaciones al flujo total de proteína microbiana al intestino delgado, con el fin de minimizar el error.

También existen diferencias importantes en el perfil de AA entre bacterias y protozoos (Czerkawski, 1976; Martin *et al.*, 1996; Shabi *et al.*, 2000) y, entre el perfil de AA de BL y BS (Tabla 8). De forma global y, considerando los valores medios presentados en dicha tabla, se podría pensar que las diferencias en el perfil son numéricamente poco importantes. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las diferencias entre poblaciones son estadísticamente significativas (Lallès *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Partiendo de los datos presentados en la Tabla 8, y calculando los valores medios para cada una de las fracciones bacterianas se puede observar, al comparar BS respecto a BL, que del total de AA considerados (16 AA), el contenido en AA (% del total de AA) fue mayor en 8 de ellos (Glu, Gly, Arg, Pro, Leu, Phe, Lys e His), menor en 5 (Asp, Ser, Thr, Ala y Val) e idéntico en los tres restantes (Met, Ile y Tyr). Cuando se discriminan por tipo de aminoácido considerado (esenciales y no esenciales), se destacan las diferencias porcentuales entre poblaciones en el contenido de ciertos AA esenciales, como es el caso de Arg (+6.8%), Val (-7.5%), Phe (+8.5%) e His (+14.3%), así como de algunos AA no esenciales, como lo es el contenido de Asp (-5.1%), Ala (-13.7%) y Pro (+24.2%), respectivamente.

Las diferencias en el perfil de AA entre BL y BS pueden explicarse, al menos parcialmente, por las mismas razones que justifican las diferencias en la relación marcador microbiano:N. Es decir, pueden ser un reflejo de las diferentes especies bacterianas presentes en las fracciones líquida y sólida de la digesta (Martin *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2000), así como también pueden estar relacionadas con la existencia de diferencias en la proporción entre la pared celular y el contenido citoplasmático en las distintas especies bacterianas, o ser

ocasionadas por el rompimiento de las células bacterianas durante el proceso de aislamiento y separación bacteriana, ya que es en el citoplasma donde se concentran los AA bacterianos (Chalupa, 1972; Rodríguez *et al.*, 2000). Martin *et al.* (1996) sugieren, además, que las diferencias en el perfil de AA entre BL y BS pueden deberse también a la mayor probabilidad que tiene el extracto bacteriano aislado de la fracción sólida de contaminarse con partículas de alimento presentes en la digesta.

#### **4.2.1.3. Otros factores que afectan la composición química de la proteína microbiana.**

Otros factores, además del tipo de población microbiana o las técnicas de aislamiento, pueden provocar cambios en la composición química y perfil de AA de la proteína de origen microbiano. Entre ellos se mencionan factores relacionados con la dieta, el régimen de alimentación, el nivel de ingestión, el tipo de animal, etc. (Czerkawski, 1976, McAllan y Smith, 1977; Clark *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Sin embargo, la información disponible en la bibliografía sobre el efecto de estos factores es limitada y a veces contradictoria, resultando difícil llegar a conclusiones claras.

Algunos autores señalan que factores relacionados con el manejo alimentario, tales como la frecuencia de alimentación, el tiempo transcurrido desde la última comida (Cecava *et al.*, 1990b; Martin *et al.*, 1994), la presencia del marcador microbiano en el alimento o su degradación incompleta en el rumen, pueden afectar a la composición química microbiana y, por ende, a la estimación del flujo de nutrientes y a la síntesis de proteína de origen microbiano. Clark *et al.* (1992) observaron que la composición química de las bacterias aisladas del rumen de vacas alimentadas con dietas diferentes, cuyos análisis fueron realizados por un mismo laboratorio con las mismas técnicas de aislamiento bacteriano y análisis, era distinta. En ese mismo artículo se señala, además, la existencia de diferencias en la relación marcador microbiano:N con el tiempo post-ingestión, el nivel de forraje de la dieta, o su composición química (fuente y cantidad de proteína en la dieta).

Tabla 8. Perfil de AA (% del total de AA) en bacterias asociadas a las fracciones líquida y sólida de la digesta.

Bact <sup>1</sup>	Aminoácido																Referencia
	Asp	Glu	Ser	Thr	Gly	Ala	Arg	Pro	Val	Met	Ile	Leu	Phe	Lys	His	Tyr	
BL	13.0	12.9	4.8	5.9	5.6	7.2 <sup>a</sup>	5.2	3.5	6.5 <sup>a</sup>	3.2 <sup>b</sup>	6.4	8.3	5.2	6.3 <sup>b</sup>	1.7 <sup>b</sup>	4.4 <sup>a</sup>	Lallès <i>et al.</i> (1992),
BS	12.9	13.1	4.8	5.4	5.2	6.3 <sup>b</sup>	5.4	3.8	6.0 <sup>b</sup>	3.6 <sup>a</sup>	6.5	8.5	5.5	6.7 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	4.2 <sup>b</sup>	In vivo
BL	11.9 <sup>a</sup>	12.7	4.6	6.6 <sup>a</sup>	6.5 <sup>a</sup>	6.2 <sup>a</sup>	4.9 <sup>b</sup>	3.4	6.5	2.6 <sup>b</sup>	5.5	7.4 <sup>b</sup>	5.1 <sup>b</sup>	9.1	1.6 <sup>b</sup>	4.9	Martin <i>et al.</i> (1996),
BS	11.5 <sup>b</sup>	12.9	4.7	6.3 <sup>b</sup>	6.2 <sup>b</sup>	5.5 <sup>b</sup>	5.3 <sup>a</sup>	4.0	6.3	3.1 <sup>a</sup>	5.6	8.3 <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>	8.5	1.8 <sup>a</sup>	4.7	<i>in vivo</i>
BL	14.4	16.9	4.9	5.7	5.1	7.1 <sup>a</sup>	4.6	--	6.4 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	6.1 <sup>b</sup>	7.8 <sup>b</sup>	5.2 <sup>b</sup>	6.8 <sup>b</sup>	1.4	5.3	Rodríguez <i>et al.</i>
BS	14.3	16.6	5.1	6.1	5.1	6.1 <sup>b</sup>	4.4	--	5.6 <sup>b</sup>	2.2 <sup>b</sup>	6.4 <sup>a</sup>	8.0 <sup>a</sup>	5.7 <sup>a</sup>	7.8 <sup>a</sup>	1.4	5.3	(2000), <i>in vivo</i>
BL	15.7 <sup>a</sup>	11.0 <sup>b</sup>	5.9 <sup>a</sup>	6.0	7.7 <sup>b</sup>	11.5 <sup>a</sup>	2.8 <sup>b</sup>	3.0 <sup>b</sup>	7.3 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>	7.6	3.2 <sup>b</sup>	6.0 <sup>a</sup>	1.0 <sup>b</sup>	2.5 <sup>b</sup>	Yang <i>et al.</i> (2001),
BS	13.7 <sup>b</sup>	12.3 <sup>a</sup>	5.5 <sup>b</sup>	5.7	9.1 <sup>a</sup>	9.8 <sup>b</sup>	3.5 <sup>a</sup>	4.4 <sup>a</sup>	6.8 <sup>b</sup>	1.4 <sup>b</sup>	5.3 <sup>b</sup>	7.6	3.8 <sup>a</sup>	5.8 <sup>b</sup>	1.4 <sup>a</sup>	2.8 <sup>a</sup>	<i>in vivo</i>
Media, BL	<b>13.8</b>	<b>13.4</b>	<b>5.1</b>	<b>6.0</b>	<b>6.2</b>	<b>8.0</b>	<b>4.4</b>	<b>3.3</b>	<b>6.7</b>	<b>2.6</b>	<b>5.9</b>	<b>7.8</b>	<b>4.7</b>	<b>7.1</b>	<b>1.4</b>	<b>4.3</b>	
Media, BS	<b>13.1</b>	<b>13.7</b>	<b>5.0</b>	<b>5.9</b>	<b>6.4</b>	<b>6.9</b>	<b>4.7</b>	<b>4.1</b>	<b>6.2</b>	<b>2.6</b>	<b>5.9</b>	<b>8.1</b>	<b>5.1</b>	<b>7.2</b>	<b>1.6</b>	<b>4.3</b>	

<sup>1</sup> Bacterias aisladas de las fracciones líquida (BL) y sólida (BS) del contenido ruminal.

<sup>a, b</sup> perfil de AA difirió estadísticamente entre BL y BS (P < 0.05).

De igual forma, Martin *et al.* (1994) observaron variaciones importantes en la composición química (contenido de MO, N, DAPA, 15N) entre bacterias y protozoos, y entre BL y BS según el tipo de dieta y el tiempo post-ingestión. El perfil de AA de la proteína microbiana también puede verse afectado por cambios relacionados con la fuente de proteína utilizada (Burriss *et al.*, 1974), el nivel de forraje en la dieta, o la adición de grasa (Hussein *et al.*, 1995). Yang *et al.* (2001) observaron diferencias tanto en la composición química (contenido de N y de 15N), como en la concentración de ciertos AA (mol/100 mol AA), cuando las dietas utilizadas diferían en el grado de procesamiento del grano de cebada (Ala y Val) y la relación forraje:concentrado (Arg, Met). Rodríguez *et al.* (2000), también observaron diferencias en la composición química de BL y BS (contenido de N, 15N, y relación bases púricas:N) y proporción de ciertos AA (Ala, Gly, Arg, Met) con el nivel de ingestión.

Por el contrario, en otros experimentos no se han podido establecer diferencias en la composición química o perfil de AA de las bacterias debidas a modificaciones en el tipo o calidad de la dieta suministrada (Olubobokun *et al.*, 1988; Cecava *et al.*, 1990b; Martin *et al.*, 1996), el tiempo post-ingestión (Olubobokun y Craig, 1990; Martin *et al.*, 1996) o el tamaño de partículas del forraje (Yang *et al.*, 2001).

En conclusión, existe suficiente evidencia de que la composición química y el contenido de AA entre las fracciones BL y BS varían en función de factores asociados con la composición química y el manejo de la alimentación. En estas condiciones, el uso de valores constantes para la composición de la proteína microbiana en los distintos sistemas de formulación para el vacuno lechero puede inducir a errores en la estimación del flujo de nutrientes de origen microbiano (INRA, 1988; Russell *et al.*, 1992; O'Connor *et al.*, 1993; Lescoat y Sauvart, 1995; NRC, 2001).

### **4.3. Composición química de la proteína microbiana y sus efectos sobre el flujo de AA de origen microbiano.**

Los actuales sistemas de racionamiento para el vacuno lechero incluyen las necesidades y los aportes de AA al intestino delgado del rumiante en sus modelos de predicción (Rulquin y Vérité, 1993; O'Connor *et al.*, 1993; NRC, 2001). Como se señaló anteriormente, una proporción importante de los AA aprovechados por el animal provienen de la proteína microbiana (Clark *et al.*, 1992; O'Connor *et al.*, 1993; Schwab, 1996; NRC, 2001). Sin embargo, en los distintos modelos de predicción utilizados por todos los sistemas de racionamiento para el vacuno lechero no se considera la posibilidad de que la composición en AA de la proteína microbiana sea variable.

En el Sistema Francés (Rulquin y Vérité, 1993; Rulquin *et al.*, 1998), el contenido en AA de la proteína microbiana utilizado en el modelo proviene de datos bibliográficos de bacterias asociadas con la fracción líquida del contenido ruminal (promedio de 66 publicaciones).

En el CNCPS (O'Connor *et al.*, 1993) también se utiliza el perfil de AA de las bacterias asociadas con la fracción líquida, aunque se toman en cuenta las diferencias en el perfil y en la digestibilidad intestinal de los AA provenientes de la pared celular y del citoplasma microbiano.

El NRC (2001) difiere de los otros sistemas de racionamiento en el método utilizado para estimar el aporte de AA al intestino delgado del rumiante. Para ello utilizan un modelo semi-mecanístico, con lo cual se elimina la necesidad de asignar valores de composición de AA a la proteína microbiana sintetizada en el rumen y a la proteína endógena (los valores de AA son asignados solamente a los ingredientes). El aporte de AA de origen microbiano y endógeno se calcula por diferencia entre el flujo total de AA y el aporte de AA de la fracción de proteína no degradada en el rumen. El modelo predice el flujo de cada uno de los AA esenciales al intestino delgado multiplicando la concentración de cada AAE en el total de AAE duodenal por el flujo de los AAE totales.

Bateman *et al.* (2001a, b) realizaron un análisis con el fin de comparar la exactitud y precisión de los distintos modelos utilizados para predecir el flujo de proteína y de AA al intestino delgado del rumiante. En base a los resultados observados, dichos autores concluyeron que las estimaciones del flujo de proteína y de AA de origen microbiano que llegan al intestino delgado difieren según el modelo matemático utilizado en la predicción. Dichas diferencias pueden ser debidas a:

- i) El uso de una composición en AA de los microorganismos inadecuada.
- ii) La imprecisión en la estimación de la cantidad total de proteína que llega al duodeno.
- iii) La imprecisión en la estimación de la cantidad de proteína microbiana que llega al duodeno.

Dado que el flujo de AA (g/d) se calcula como:

$$\text{g AA/d} = \text{g AA/g MSbact (perfil de AA)} \times \text{g MSbact/d (síntesis microbiana)}$$

Es lógico pensar que cualquier error cometido en la medición de alguno de los componentes de la ecuación puede resultar en grandes diferencias en la estimación de la cantidad de AA de origen microbiano que llegan al intestino delgado del rumiante, dado que el efecto es multiplicativo. Por ejemplo, el hecho de considerar que el perfil de AA de las bacterias es constante, a pesar de la variación observada en el perfil de AA de las bacterias (Clark *et al.*, 1992), y entre bacterias asociadas con la fracción líquida y sólida del contenido ruminal (Martin *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001), puede conducir a errores importantes en la estimación del flujo de AA microbianos. Aunque existe muy poca información al respecto, algunos datos (Klusmeyer *et al.*, 1991) indican que variaciones en el perfil de AA entre BL y BS se relacionan con diferencias en el flujo de AA cuando se utilizan aislados microbianos obtenidos de distintas fracciones del contenido ruminal (BL, BS, o su mezcla).



## **5. Conclusiones.**

Es evidente que la inclusión de las necesidades y aportes de AA al intestino delgado del rumiante constituye un importante avance en la formulación proteica para el vacuno lechero. Sin embargo, la fiabilidad de los modelos de predicción actualmente en uso es baja (Bateman *et al.*, 2001a, b). Además, el conocimiento de las necesidades y aportes de AA específicos para el rumiante es muy limitado (NRC, 2001). Por otro lado, aunque existe suficiente información referente a la cuantificación y los factores que afectan el flujo de proteína microbiana al intestino delgado del rumiante (Stern y Hoover, 1979; Hoover y Stokes, 1991; Clark *et al.*, 1992; Stern *et al.*, 1994), la información sobre el flujo de AA de origen microbiano, y los factores que lo afectan, es muy limitada. Por ello es necesario realizar estudios que permitan su cuantificación de una manera precisa, así como evaluar los factores que lo afectan, con el fin de incluirlos en los modelos de predicción y mejorar la fiabilidad en los valores estimados.

## 6. Objetivos.

Los principales factores responsables de variaciones en el flujo de aminoácidos de origen microbiano al intestino delgado del rumiante están relacionados con la dieta (fuentes de energía y proteína, forma de presentación, tamaño de partícula del forraje, ...), con el manejo de la alimentación (frecuencia de alimentación, nivel de ingestión, ...), y los efectos que la modificación de dichos factores provocan en el medio ruminal (pH ruminal, tasa de dilución, ...). Además, es posible que la población microbiana utilizada como referencia (bacterias aisladas de las fracciones líquida y sólida del contenido ruminal) contribuya de forma importante a la variabilidad en la estimación del flujo de aminoácidos de origen microbiano.

Dada las dificultades que existen para estudiar *in vivo* y de forma aislada estos factores, se utilizó un sistema de cultivo continuo de flujo doble (fermentadores). Los objetivos generales de la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- a. Estudiar el efecto algunos factores relacionados con la dieta (nivel de fibra y tamaño de partículas del forraje) o las condiciones de fermentación (pH y tasa de dilución) sobre los parámetros de fermentación y el metabolismo del nitrógeno en el rumen, utilizando para ello un sistema de cultivo continuo de flujo doble.
- b. Evaluar el efecto de varios factores relacionados con la dieta (nivel de fibra y tamaño de partículas del forraje) o con las condiciones de fermentación (pH y tasa de dilución) sobre el perfil y flujo de AA de origen microbiano en fermentadores de cultivo continuo de flujo doble.
- c. Analizar la composición química de las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida del contenido del fermentador y evaluar el efecto de su utilización en la estimación de los parámetros de fermentación y metabolismo del nitrógeno en el rumen, así como en el perfil y flujo de AA de origen microbiano.

## 7. Referencias bibliográficas.

- Agricultural and Food Research Council (AFRC). 1993. Energy and Protein Requirements of Ruminants. CAB International. Wallingford, UK.
- Akin, D. E. 1979. Microscopic evaluation of forage digestion by rumen microorganisms. A review. J. Anim. Sci. 48:701-710.
- Aldrich, J. M., L. D. Muller, G. A. Varga, and L. C. Griel. 1993. Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation, nutrient flow, and performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 76:1091-1105.
- Archimède, H., D. Sauvant, and P. Schmidely. 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. Reprod. Nutr. Dev. 37:173-189.
- Argyle, J. L., and R. L. Baldwin. 1989. Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields. J. Dairy Sci. 72:2017-2027.
- Bach, A., I. K. Yoon, M. D. Stern, H. G. Jung, and H. Chester-Jones. 1999. Effects of type of carbohydrate supplementation to lush pasture on microbial fermentation in continuous culture. J. Dairy Sci. 82:153-60.
- Baldwin, R. L., and M. J. Allison. 1983. Rumen metabolism. J. Anim. Sci. 57:461-477. Suppl. 2.
- Bateman II, H. G., J. H. Blake, W. L., J. H. Clark, R. A. Patton, C. J. Peel, and C. G. Schwab. 2001a. Accuracy and precision of computer model to predict passage of crude protein and amino acids to the duodenum of lactating cows. J. Dairy Sci. 84:649-664.
- Bateman II, H. G., J. H. Clark, R. A. Patton, C. J. Peel, and C. G. Schwab. 2001b. Prediction of crude protein and amino acid passage to the duodenum of lactating cows by models compared with *in vivo* data. J. Dairy Sci. 84:665-679.

- Bauchart, D., F. Legay-Carmier, M. Doreau, and J. P. Jouany. 1986. Effect of the addition of non-protected fat in rations for milk cows over the concentration and chemical composition of rumen bacteria and protozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 26:309-310.
- Bauchop, T., and S. R. Elsdon. 1960. The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* 23:457-469.
- Beever, D. E. 1993. Rumen Function. Pages 187-215 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- Beever, D. E., D. F. Osbourn, S. B. Cammel, and R. A. Terry. 1981. The effect of grinding and pelleting on the digestion of Italian ryegrass and timothy by sheep. *Br. J. Nutr.* 46:357-370.
- Beever, D. E., D. G. Harrison, J. B. Thompson, S. B. Cammell, and D. F. Osbourn. 1974. A method for the estimation of dietary and microbial protein in duodenal digesta of ruminants. *Br. J. Nutr.* 32:99-112.
- Benchaar, C., C. Bayourthe, M. Vernay, and R. Moncoulon. 1995. Composition chimique des bactéries libres ou adhérentes au contenu du rumen et du duodénum chez la vache. *Ann. Zootech.* 44: 139, Suppl.
- Berentsen, P. B., G. W. Giesen, and S. C. Verduyn. 1992. Manure legislation effects on income and on N, P and K losses in dairy farming. *Lives. Prod. Sci.* 31:43-56.
- Bourquin, L. D., E. C. Titgemeyer, J. Van Milgen, and G. C. Fahey. 1994. Forage level and particle size effects on orchardgrass digestion by steers: II. Ruminal digestion kinetics of cell wall components. *J. Anim. Sci.* 72:759-767.
- Broderick, G. A., and N. R. Merchen. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy Sci.* 75:2618-2632.

- Broderick, G. A., R. J. Wallace, and E. Ørskov. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. Pages 541-592 in *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima (eds). Academic Press, Orlando, FL, USA.
- Broudiscou, L., and J. P. Jouany. 1995. Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. *Reprod. Nutr. Dev.* 35:517-535.
- Burris, W. R., N. W. Bradley, and J. A. Boling. 1974. Amino acid availability of isolated rumen microbes as affected by protein supplement. *J. Anim. Sci.* 38:200-204.
- Calsamiglia, S., A. Ferret and M. Devant. 2002. Effect of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:574-579.
- Calsamiglia, S., M. D. Stern, and J. L. Firkins. 1995. Effects of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 73:1819-1827.
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia y A. Ferret. 2001. Efecto del pH sobre la fermentación microbiana y el flujo de nutrientes en un sistema de doble flujo continuo. *ITEA* 22:364-366. Vol. Extra.
- Casper, D. P., H. A. Maiga, M. J. Brouk, and D. J. Schingoethe. 1999. Synchronization of carbohydrate and protein sources on fermentation and passage rates in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:1779-1790.
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. C. Gay, and L. L. Berger. 1990b. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency and isolation techniques. *J. Dairy Sci.* 73:2480-2488.
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. L. Berger, and G. C. Fahey Jr. 1990a. Intestinal supply of amino acids in sheep feed alkaline hydrogen peroxide-treated wheat straw-based diets supplemented with soybean meal or combination of corn gluten meal and blood meal. *J. Anim. Sci.* 68:467-477.

- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. L. Berger, R. I. Mackie, and G. C. Fahey Jr. 1991. Effect of dietary energy level and protein source on nutrient digestion and ruminal nitrogen metabolism in sheep. *J. Anim. Sci.* 69:2230-2243.
- Chalupa, W. 1972. Metabolic aspects of non-protein nitrogen utilization in ruminant animals. *Fed. Proc.* 31:1152-1164.
- Chalupa, W., and B. Bloch. 1983. Responses of rumen bacteria sustained in semicontinuous culture to amino N and to branched chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* 66:152 Suppl. 1.
- Chamberlain, D. G., and P. C. Thomas. 1980. The effects of urea and artificial saliva on rumen bacterial protein synthesis in sheep receiving a high-cereal diet. *J. Sci. Food Agric.* 31:432-438.
- Chase, L. E. 1996. Practical application of amino acid concepts for dairy cattle. Pages 208-213 in *Proceeding of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. October 22-24<sup>th</sup>, 1996. Rochester NY. USA.
- Chen, G., C. J. Sniffen, and J. B. Russell. 1987. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: Effects of protein solubility and feeding frequency. *J. Dairy Sci.* 70:983-992.
- Cheng, K. J., D. E. Akin, and J. W. Costerton. 1977. Rumen bacteria: Interaction with particulate dietary components and response to dietary variations. *Fed. Proc.* 36:193-197.
- Cheng, K. J., J. Fay, and R. Howarth. 1980. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:613-619.
- Clark, J. H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 75:2304-2323.
- Cotta, M. A., and J. B. Russell, 1982. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 65:226-234.

- Cotta, M. A., and R. B. Hespell. 1986. Protein and amino acids metabolism of rumen bacteria. Pages 122-136 in Control of Digestion and Metabolism in Ruminants. L. P. Milligan, W. L. Grovum, and A. Dobson (eds). Prentice-Hall, Englewoods Cliffs, NJ. USA.
- Cozzi, G., I. Andrighetto, P. Berzaghi, and C. E. Polan. 1995. In situ ruminal disappearance of essential amino acids in protein feedstuffs. J. Dairy Sci. 78:161-171.
- Craig, W. M., D. R. Brown, G. A. Broderick, and D. B. Ricker. 1987. Post-prandial compositional changes of fluid-and particle-associated ruminal microorganisms. J. Anim. Sci. 65:1042-1048.
- Crawford, R. J., W. H. Hoover, and L. L. Junkins. 1980b. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. II. Nitrogen partition and efficiency of microbial synthesis. J. Anim. Sci. 51:986-995.
- Crawford, R. J., W. H. Hoover, and P. H. Knowlton. 1980a. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fiber digestion, VFA production and protozoa number. J. Anim. Sci. 51:986-995.
- Cruz-Soto, R., S. A. Muhammad, C. J. Newbold, C. S. Steward, and R. J. Wallace. 1994. Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria *in vitro*. Anim. Feed. Sci. Technol. 49:151-161.
- Czerkawski, J. W. 1976. Chemical composition of microbial matter in the rumen. J. Sci. Food Agric. 27:621-632.
- De Veth, M. J., and E. S. Kolver. 2001b. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. J. Dairy Sci. 84:2066-2072.
- De Veth, M. J., and E. S. Kolver. 2001a. Digestion of Ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. J. Dairy Sci. 84:1449-1457.
- Dehority, B. 1993. Microbial ecology of cell wall fermentation. Pages 425-453 in Forage Cell Wall Structure and Digestibility. H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (eds). ASSA-CSSA-SSSA, Madison, WI. USA.

- Demeyer, D. I. 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. Pages 217-237 in Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. J. P. Jouany (eds). INRA. Paris, France.
- Demeyer, D. I., and C. J. Van Nevel. 1979. Protein fermentation and growth by rumen microbes. *Ann. Rech. Vet.* 10:277-279.
- Demeyer, D. L., and C. J. Van Nevel. 1986. Influence of substrate and microbial interaction on efficiency of rumen microbial growth. *Reprod. Nutr. Dev.* 26:161-179.
- Dewhurst, R. J., D. R. Davues, and R. J. Merry. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85:1-21.
- Dijkstra, J., H. D. St. C. Neal, D. E. Beaver, and J. France. 1992. Simulation of nutrient digestion, absorption and outflow in the rumen. *J. Nutr.* 122:2239-2256.
- Dijkstra, J., J. France, and D. R. Davies. 1998. Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. *J. Dairy Sci.* 81:3370-3384.
- Dinius, D. A., M. E. Simpson, and P. B. Marsh. 1976. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. *J. Anim. Sci.* 42:229-234.
- Erasmus, L. J., P. M. Botha, H. M. Meissner. 1994. Effect of protein source on ruminal fermentation and passage of amino acids to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 77:3655-3665.
- Erfle, J. D., R. J. Boila, R. M. Teather, S. Mahadevan, and F. D Sauer. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 65:1457-1464.
- Fahey, G. C., Jr., L. D. Bourquin, E. C. Titgemeyer, and D. G. Atwell. 1993. Postharvest treatment of fibrous feedstuffs to improve their nutritive value. Pages 715-766 in Forage Cell Wall Structure and Digestibility H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, J. Ralph (eds). Madison, WI. USA.



- Faichney, G. J. 1993. Digesta flow. Pages 53-85 in Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- Feng, P., W. H. Hoover, T. K. Miller, and R. Blauwiekel. 1993. Interactions of fiber and nonstructural carbohydrates on lactation and ruminal function. *J. Dairy Sci.* 76:1324-1333.
- Firkins, J. L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *J. Nutr.* 126:1347S-1354S.
- Firkins, J. L., L. L. Berger, N. R. Merchen, G. C. Fahey, and R. L. Mulvaney. 1987. Ruminal nitrogen metabolism in steers as affected by feed intake and dietary urea concentration. *J. Dairy Sci.* 70:2302-2311.
- Firkins, J. L., M. S. Allen, B. S. Oldick, and R. St-Pierre. 1998. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. *J. Dairy Sci.* 81:3350-3369.
- France, J. and R. C. Siddons. 1993. Volatile fatty acid production. Pages 107-121 in Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- Galyean, M. L., and A. L. Goetsch. 1993. Utilization of forage fiber by ruminants. Pages 33-71 in Forage Cell Wall Structure and Digestibility. H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (eds). Madison, WI. USA.
- Goad, D. W., C. L. Goad, and T. C. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76:234-241.
- Griswold, K. E., W. H. Hoover, T. K. Miller, and M. V. Thayne. 1996. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 74:483-491.

- Gunter, S. A., L. J. Krysl, M. B., J. T. Broesder, and R. K. Barton. 1991. Influence of branched-chain fatty acid supplementation on voluntary intake, site and extent of digestion, ruminal fermentation, digesta kinetics and microbial protein synthesis in beef heifers consuming grass hay. *J. Anim. Sci.* 68:2885-2892.
- Haïmoud, D. A., C. Bayourthe, R. Moncoulon, and M. Vernay. 1996. Avoparcin and monensin effects on digestive function in cows fed a high forage diet. *J. Sci. Food Agric.* 70:181-189.
- Han, H., H. S. Hussein, H. A. Glimp, D. H. Taylor, and L. W. Grenet. 2002. Carbohydrate fermentation and nitrogen metabolism of a finish beef diet by ruminal microbes in continuous cultures as affected by ethoxyquin and (or) supplementation of monensin and tylosin. *J. Anim. Sci.* 80:1117-1123.
- Harfoot, G. G. 1981. Lipid metabolism in the rumen. Pages 21-55 in *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. W. W. Christie (ed). Pergamon Press, Oxford.
- Harrison, D. G., and A. B. McAllan. 1980. Factors affecting microbial growth yields in the reticulo-rumen. Pages 205-226 in *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Y. Ruckebusch and P. Thivend (eds). Westport, USA.
- Harrison, D. G., D. E. Beever, D. J. Thompson, and D. F. Osbourn. 1975. Manipulation of ruminal fermentation in sheep by increasing the rate of flow of water from the rumen. *J. Agric. Sci. Camb.* 85:93-101.
- Henning, P. H., D. G. Steyn, and H. H. Meissner. 1993. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. *J. Anim. Sci.* 71:2516-2528.
- Herrera-Saldana, R., R. Gómez-Alarcón, M. Torabi, and J. T. Huber. 1990. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 73:142-148.

- Hespell, R. B., and M. P. Bryant. 1979. Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors on  $Y_{ATP}$ . J. Anim. Sci. 49:1641-1659.
- Hino, T., and J. Russell. 1987. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein *in vitro*. J. Anim. Sci. 1987. 64:261-270.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. Symposium: Protein and fiber digestion, passage and utilization in lactating cows. J. Dairy Sci. 69:2755-2766.
- Hoover, W. H., and S. R. Stokes. 1991. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. J. Dairy Sci. 74:3630-3644.
- Hoover, W. H., and T. K Miller. 1996. Contributions of microbial protein to amino acid supply. Pages 199-206 in Proceeding of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. October 22-24th, 1996. Rochester NY. USA.
- Hoover, W. H., and T. K. Miller. 1992. Rumen digestive physiology and microbial ecology. Bulletin 708T of the Agriculture and Forestry Experimental Station. West Virginia University, USA. 36 pp.
- Hoover, W. H., C. R. Kincaid, G. A. Varga, W. V. Thaine, and L. L. Junkin, Jr. 1984. Effects of solid and liquid flows on fermentation in continuous culture. IV. pH and dilution rate. J. Anim. Sci. 58:692-699.
- Hoover, W. H., R. J. Crawford, and M. D. Stern. 1982. Effects of solid and liquid flows on fermentation in continuous culture. III. Solid retention time. J. Anim. Sci. 54:849-854.
- Hsu, J. T., and G. C. Fahey. 1990. Effects of centrifugation speed and freezing on composition of ruminal bacteria samples collected from defaunated sheep. J. Dairy Sci. 73:149-152.
- Hume, I. D. 1970a. Synthesis of microbial protein in the rumen. II. A response to higher volatile fatty acids. Aust. J. Agric. Res. 21:297-304.

- Hume, I. D. 1970b. Synthesis of microbial protein in the rumen. III. The effect of dietary protein. Aust. J. Agric. Res. 21:305-314.
- Hume, I. D., and P. R. Bird. 1970c. Synthesis of microbial protein in the rumen. IV. The influence of the level and form of nitrogen. Australian J. Agric. Res. 21:315-323.
- Hussein, H. S., N. R. Merchen, and G. C. Fahey Jr. 1995. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary forage level and fat supplementation. Anim. Sci. 73:2469-2473.
- Hvelplund, T., and J. Madsen. 1985. Amino acid passage to the small intestine in dairy cows compared with estimates of microbial protein and undegraded dietary protein from analysis on the feed. Acta Agric. Scand. (Suppl). 25:20-35.
- Illg, D. J., and M. D. Stern. 1994. *In vitro* and *in vivo* comparisons of diaminopimelic acid and purines for estimating protein synthesis in the rumen. Anim. Feed Sci. Technol. 48:49-55.
- INRA. 1978. Alimentation des ruminants. INRA publications. Versailles, France.
- INRA. 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. R. Jarrige (éd). INRA Publications. Paris, France.
- Isaacson, H. R., F. C. Hinds, M. P. Bryant, and F. N. Owens. 1975. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continuous culture. J. Dairy Sci. 58:1645-1659.
- Jalc, D., and A. Laukova. 2002. Effect of nisin and monensin on rumen fermentation in the artificial rumen. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 115:6-10 (Abstr).
- Jalc, D., M. Baran, T. Vendrak, and P. Siroka. 1992. Effect of monensin on fermentation of hay and wheat bran investigated by the rumen simulation technique (Rusitec). 2. End products of fermentation and protein synthesis. Arch. Tierernahr. 42:153-158 (Abstr).

- Jalc, D., S. Kisidayova, and F. Nerud. 2002. Effect of plant oils and organic acids on rumen fermentation in vitro. *Folia Microbiol.* 47:171-177 (Abstr).
- Jenkins, T. C., and D. L. Palmquist. 1984. Effects of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.* 67:978-986.
- Jones, D. F., W. H. Hoover, and T. K. Miller Webster. 1998. Effects of concentrations of peptides on microbial metabolism in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 76:611-616.
- Jouany, J. P., L. Broudicou, R. A. Prins, and S. Komisarczuk-Bony. 1995. Métabolisme et nutrition de la population microbienne del rumen. Pages 349-381 in *Nutrition des Ruminants Domestiques*. Jarrige, R., Y. Ruckebush, C. Demarquilly, M. H. Farce, and M. Journet (eds). INRA. Paris, France.
- Kennedy, P. H., and L. P. Milligan. 1978. Effect of cold exposure on digestion, microbial synthesis and nitrogen transformation in sheep. *Br. J. Nutr.* 39:105-117.
- Kennedy, P. H., R. J. Christopherson, and L. P. Milligan. 1976. Effect of cold exposure on digestion, rumen turnover time and microbial synthesis. *Br. J. Nutr.* 36: 231-242.
- Klusmeyer, T. H., G. L. Lynch, J. H. Clark, and D. R. Nelson. 1991. Effects of calcium salts of fatty acids and protein source on ruminal fermentation and nutrient flow to duodenum of cows. *J. Dairy Sci.* 74:2206-2219.
- Klusmeyer, T. H., R. D. McCarthy, Jr., J. H. Clark, and D. R. Nelson. 1990. Effects of source and amount of protein on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 73:3526-3537.
- Komisarczuk, S., M. Durand, Ph. Beaumatin, and G. Hannequart. 1987. Utilisation de l'azote 15 pour la mesure de la protéosynthèse microbienne dans les phases solide et liquide d'un fermenteur semi-continue (Rusitec). *Reprod. Nut. Dev.* 27:261-262.

- Kudo, H., K. J. Cheng, and J. W. Costerton. 1987. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Can. J. Microbiol.* 33:267-272.
- Kung, L., Jr., and L. M. Rode. 1996. Amino acid metabolism in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59:167-172.
- Kung, L., Jr., R. S. Tung, and B. R. Carmean. 1992. Rumen fermentation and nutrient digestion in cattle fed diets varying in forage and energy source. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 39:1-15.
- Lallès, J. P., C. Poncet, and R. Toullec. 1992. Composition en acides amines des bactéries libres et des bactéries fixées aux particules alimentaires du retículo-rumen du veau sevré et du mouton recevant différentes rations. *Ann. Zootech.* 41:75-76.
- Legay-Carmier, F., and D. Bauchart. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soybean oil. *Br. J. Nutr.* 61:725-740.
- Leng, R. A., and J. V. Nolan. 1984. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 67:1027-1089.
- Lescoat, P., and D. Sauvant. 1995. Development of a mechanistic model for rumen digestion validated using the duodenal flux of amino acids. *Reprod. Nut. Dev.* 35:45-70.
- Mabjeesh, S. J., A. Arieli, I. Bruckental, S. Zamwell, and H. Tagari. 1997. Effect of ruminal degradability of crude protein and nonstructural carbohydrates on the efficiency of bacterial crude protein synthesis and amino acids flow to the abomasum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2939-2949.
- Mackie, R. I., and B. A. White. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *J. Dairy Sci.* 73:2971-2995.
- Maeng, W. J., and R. J. Baldwin. 1976. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: Effects of urea and amino acids over time. *J. Dairy Sci.* 59:643-647.

- Marais, J. P. 2000. Use of markers. Pages 255-277 in *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. J. P. F. D'Mello (ed). CAB International. Wallingford, UK.
- Martin, C, L. Bernard, and B. Michalet-Doreau. 1996. Influence of sampling time and diet on amino acid composition of protozoa and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *J. Anim. Sci.* 74:1157-1163.
- Martín, C., A. G. Williams, and B. Michalet-Doreau. 1994. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal content. *J. Anim Sci.* 72:2962-2968.
- Martin, S. A. 1998. Review: Manipulation of ruminal fermentation with organic acids. *J. Anim. Sci.* 76:3123-3132.
- McAllan, A. B., and R. H. Smith. 1974. Carbohydrate metabolism in the ruminant. Bacterial carbohydrates formed in the rumen and their contribution to digesta entering the duodenum. *Br. J. Nutr.* 31:77-88.
- McAllan, A. B., and R. H. Smith. 1977. Some effects of variation in carbohydrate and nitrogen intakes on the chemical composition of mixed rumen bacteria from young steers. *Br. J. Nutr.* 37:55-65.
- McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, and K. J. Cheng. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.*:72:3004-3018.
- McAllister, T. A., L. M. Rhode, K. J. Cheng, and J. G. Buchanan-Smith. 1990. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Can. J. Anim. Sci.* 70:571-579.
- McAllister, T. A., R. C. Phillippe, L. M. Rode, and K. J. Cheng. 1993. Effects of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 71:205-212.
- McCarthy, R. D., Jr., T. H. Klusmeyer, J. L. Vicini, J. H. Clark, and D. R. Nelson. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016.

- Mehrez, A. Z., E. R. Ørskov, and I. McDonald. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* 38:437-443.
- Meng, Q., M. S. Kerley, P. A. Ludden, and R. L. Belyea. 1999. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 77:206-214.
- Merchen, N. R., J. L. Firkins, and L. L. Berger. 1986. Effect of intake and forage level on ruminal turnover rates, bacterial protein synthesis and duodenal amino acid flows in sheep. *J. Anim. Sci.* 62:216-225.
- Merry, R. J., and A. B. McAllan. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* 50:701-709.
- Mould, F. L., and E. R. Ørskov. 1984. Manipulation of ruminal fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:1-14.
- Mould, F. L., E. R. Ørskov, and S. O. Mann. 1983. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
- Muntifering, R. B., B. Theurer, and T. H. Noon. 1981. Effects of monensin on site and extent of whole corn digestion and bacterial protein synthesis in beef steers. *J. Anim. Sci.* 53:1565-1573.
- National Research Council. 1978. *Nutrient Requirement of Dairy Cattle*. 5<sup>th</sup> rev. ed. National Academic Press, Washington, DC.
- National Research Council. 1985. *Ruminant Nitrogen Usage*. National Academic Press, Washington, DC.
- National Research Council. 1989. *Nutrient Requirement of Dairy Cattle*. 6<sup>th</sup> rev. ed. National Academic Press, Washington, D. C.



- National Research Council. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> rev. ed. National Academic Press, Washington, DC.
- Nocek, J. E., and J. B. Russell. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:2070-2107.
- Nocek, J. E., and S. Tamminga. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74:3598-3629.
- Nolan, J. V. 1993. Nitrogen kinetics. Pages 123-143 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- Nolan, J. V., and R. A. Leng. 1972. Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.* 27:177-194.
- Nozière, P., and B. Michalet-Doreau. 1997. Effects of amount and availability of starch on amylolytic activity of ruminal solid-associated microorganisms. *J. Sci. Food Agric.* 73:471-476.
- O'Connor, J. D., C. J. Sniffen, D. G. Fox., and W. Chalupa. 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV Predicting amino acid adequacy. *J. Dairy Sci.* 71:1298-1311.
- Oldham, J. D. 1996. Protein requirements system for ruminants. Pages 3-27 in *Progress in Dairy Science*. C. J. C. Phillips (ed). CAB International, Wallingford, UK.
- Oldham, J. D., and J. R. Ling. 1977. Measurement of the rate of flow of dry matter in digesta passing through the duodenum of sheep. *Br. J. Nutr.* 37:333-343.
- Oldham, J. D., J. D. Sutton, and A. B. McAllan. 1979. Protein digestion and utilization by dairy cows. *Ann. Rech. Vet.* 10:290-293.

- Olubobokun, J. A., and W. M. Craig. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 68:3360-3370.
- Olubobokun, J. A., W. M. Craig, and W. A. Nipper. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 66:2701-2710.
- Orpin, C. G. 1983/1984. The role of ciliate protozoa and rumen fungi in the digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:121-143.
- Ørskov, E. R. 1988. *Nutrición proteica de los rumiantes*. Editorial Acribia. Zaragoza- España.
- Overton, T. R., M. R. Cameron, J. P. Elliot, J. H. Clark, and D. R. Nelson. 1995. Ruminal fermentation and passage of nutrients to the duodenum of lactating cows fed mixtures of corn and barley. *J. Dairy Sci.* 78:1981-1988.
- Owen, F. N., and A. L. Goetsch. 1988. Ruminal fermentation. Pages 145-171 in *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*. D. C. Church (ed). Waveland Press, Inc. Illinois, USA.
- Owen, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Pérez, J. F. Utilización de la excreción renal de metabolitos de las bases púricas como estimador indirecto de la síntesis de proteína microbiana en el rumen. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, España.
- Pérez, J. F., J. Balcells, M. Fondevila, and J. A. Guada. 1998. Composition of liquid- and particle-associated bacteria and their contribution to the rumen outflow. *Aus. J. Agric. Res.* 49:907-914.
- Pitt, R. E., J. S. Van Kessel, D. G. Fox, A. N. Pell, M. C. Barry, and P. J. Van Soest. 1996. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *J. Anim. Sci.* 74:226-244.

- Robinson, P. H., C. J. Sniffen, and P. J. Van Soest. 1985. Influence of level of feed intake on digestion and bacterial yield in the forestomachs of dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 68:437-444.
- Rode, L. M., and L. D. Satter. 1988. Effect of amount and length of alfalfa hay in diets containing barley or corn on site of digestion and rumen microbial protein synthesis in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 68:445-454.
- Rode, L. M., D. C. Weakley, and L. D. Satter. 1985. Effect of forage amount and particle size in diets of lactating dairy cows on site of digestion and microbial protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.* 65:101-111.
- Rodríguez, C. A., J. González, M. R. Alvir, J. L. Repetto, C. Centeno, and F. Lamrani. 2000. Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. *Br. J. Nutr.* 84 :369-376.
- Rooke, J. A., N. H. Lee, and D. G. Amstrong. 1987. The effects of intraruminal infusions of urea, casein, glucose syrup and a mixture of casein and glucose syrup on nitrogen digestion in the rumen of cattle receiving grass-silage diets. *Br. J. Nutr.* 57:89-98.
- Rulquin, H., and R. Vérité. 1993. Amino acid nutrition of dairy cows: productive effects and animal requirements. Pages 55-77 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, UK.
- Rulquin, H., J. Guinar, and R. Vérité. 1998. Variation in amino acid content in the small intestine digesta of cattle. Development of a prediction model. *Livestock Prod. Sci.* 53:1-13.
- Russell, J. B. 1991. Intracellular pH of acid tolerant ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 3383-3384.
- Russell, J. B. 1998a. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76:1955-1963.
- Russell, J. B. 1998b. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 81:3222-3230.

- Russell, J. B., and C. J. Sniffen. 1984. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria *in vitro*. J. Dairy Sci. 67:987-994.
- Russell, J. B., and D. B. Dombroski, 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol., 39:604-610.
- Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. J. Dairy. Sci. 79:1503-1509.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1987. Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria. J. Dairy Sci. 70:970-976.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1993. Microbial energetics. Pages 165-176 in Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- Russell, J. B., and R. J. Wallace. 1988. Energy-yielding and energy-consuming reactions. Pages 185-215 in The Rumen Microbial Ecosystem. P. N. Hobson (eds). Elsevier Applied Science, London, England.
- Russell, J. B., C. J. Sniffen, and P. J. Van Soest. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. J. Dairy Sci. 66:763-775.
- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A Net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. J. Anim. Sci., 70:3551-2561.
- Russell, J. B., W. M. Sharp, and R. L. Baldwin. 1979. The effect of pH on maximum bacterial growth rate and its possible role as determinant of bacterial completion in the rumen. J. Anim. Sci. 48:251-255.
- Salter, D. N., K. Daneshaver, and R. H. Smith. 1979. The origin of nitrogen incorporated into compounds in the rumen bacteria of steers given protein- and urea-containing diets. Br. J. Nutr. 41:197-209.

- Satter, L. D. 1986. Protein supply from undegraded dietary protein. *J. Dairy Sci.* 69:2734-2749.
- Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Sauvant, D., F. Meschy, and D. Mertens. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Prod. Anim.* 12:49-60.
- Schadt, I., W. H. Hoover, T. K. Miller, W. V. Thayne, and G. Licitra. 1999. Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 77:485-491.
- Schingoethe, D. J. 1988. Nutrients needs of ruminants versus monogastric species. Pages 448-455 in *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. D. C. Church (ed). Waveland Press Inc. Illinois, USA.
- Schingoethe, D. J. 1996. Balancing the amino acid needs of the dairy cow. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 60:153-160.
- Schwab, C. G. 1996. Amino acid nutrition of the dairy cow: Current status. Pages 184-198 in *Proceeding of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Rochester, NY, USA.
- Shabi, Z., H. Tagari, M. R. Murphy, I. Bruckental, S. J. Mabeesh, S. Zamwel, K. Celik, and A. Arieli. 2000. Partitioning of amino acids flowing to the abomasum into feed, bacterial, protozoal, and endogenous fractions. *J. Dairy Sci.* 83:2326-2334.
- Shaefen, D. M., C. L. Davis, and M. P. Bryant. 1980. Ammonia saturation constants for predominant species of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 63:1248-1263.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, and W. V. Thaine. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69:413-419.

- Siddons, R. C., J. V. Nolan, D. E. Beever, and J. C. MacRae. 1985. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. *Br. J. Nutr.* 54:175-187.
- Sinclair, L. A., P. C. Garnsworthy, J. R. Newbold, and P. J. Buttery. 1995. Effects of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen release in diets with similar carbohydrate composition on rumen fermentation and microbial protein synthesis in sheep. *J. Agric. Sci.* 124:463-472.
- Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43:910-929.
- Smith, R. H., A. B. McAllan, D. Hewitt, and P. E. Lewis. 1978. Estimation of amounts of microbial and dietary nitrogenous compounds entering the duodenum of cattle. *J. Agric. Sci.* 90:557-568.
- Smith, R. H., and A. B. McAllan. 1974. Some factors influencing the chemical composition of mixed rumen bacteria. *Br. J. Nutr.* 31:27-34.
- Smith, W. R., I. Yu, and R. E. Hungate. 1973. Factors affecting cellulolysis by *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.* 414:729-737.
- Sniffen, C. J., and P. H., Robinson. 1987. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. *J. Dairy Sci.*, 70:425-441.
- Sniffen, C. J., J. B. Russell, and P. J. Van Soest. 1983. The influence of carbon source, nitrogen source and growth factors on rumen microbial growth factor in rumen microbial growth. *Proc. Cornell Nutr. Conf. Ithaca, NY*:26-33.
- Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. J. Fox, and J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 72:3562-3577.
- Spicer, L. A., C. B. Theurer, J. Sowe, and T. H. Noon. 1986. Ruminant and post-ruminant utilization of nitrogen and starch from sorghum grain, corn and barley-based diets by beef steers. *J. Anim. Sci.* 62:521-529.

- Stern, M. D., and W. H. Hoover. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. *J. Anim. Sci.* 49:1590-1603.
- Stern, M. D., G. A. Varga, J. H. Clark, J. L. Firkins, J. T. Huber, and D. L. Palmquist. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 77:2762-2786.
- Stern, M. D., W. H. Hoover, and C. J. Sniffen. 1978. Effects of nonstructural carbohydrate, urea and soluble protein level on microbial protein synthesis in continuous culture of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 47:944-956.
- Stokes, S. R., W. H. Hoover, T. K. Miller, and R. P. Manski. 1991a. Impact of carbohydrate and protein levels on bacterial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 74:860-870.
- Stokes, S. R., W. H. Hoover, T. K. Miller, R. Blauweikel. 1991b. Ruminal digestion and microbial utilization of diets varying in type of carbohydrate and protein. *J. Dairy Sci.* 74:871-880.
- Storm, E., and E. R. Ørskov. 1983. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminant. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. *Br. J. Nutr.* 50:463-470.
- Storm, E., and E. R. Ørskov. 1984. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminant. 4. The limiting amino acids of microbial protein in growing sheep determined by a new approach. *Br. J. Nutr.* 52:613-620.
- Stouthamer, A. H., and C. W. Bettenhausen. 1973. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 301:53-70.
- Strobel, H. J., and J. B. Russell. 1986. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 69:2941-2947.
- Sutton, J. D., R. Knight, A. B. McAllan, and R. H. Smith. 1983. Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. *Br. J. Nutr.* 49:419-432.

- Tamminga, S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.* 49:1615-1630.
- Tamminga, S. 1996. A review on environmental impact of nutritional strategies in ruminants. *J. Anim. Sci.* 74:3112-3124.
- Tamminga, S., and G. Hof. 2000. Feeding system for dairy cows. Pages 109-127 in *Feeding System and Feed Evaluation Models*. CAB International. M. K. Theodorou and J. France (eds). Wallingford, UK.
- Tamminga, S., and X. B. Chen. 2000. Animal-based techniques for the estimation of protein value of forages. Pages 215-231 in *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford, and H. M. Omed (eds). CAB International. Wallingford, UK.
- Theodorou, M. K., and J. France. 1993. Rumen microorganisms and their interactions. Pages 146-163 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- Timmermans, S. J. Jr., L. M. Johnson, J. H. Harrison, and D. Davidson. 2000. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using milk uric acid or allantoin. *J. Dairy Sci.* 83:1286-1299.
- Titgemeyer, E. C. 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *J. Anim. Sci.* 75:2235-2247.
- Uden, P. 1988. The effect of grinding and pelleting hay on digestibility, fermentation rate, digesta passage and rumen and fecal particle size in cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 19:145-157.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2002. <http://www.usda.gov/nass/aggraphs/cowrates.htm>; <http://www.usda.gov/mannlib.cornell.edu/reports/nassr.dairy/pmp.bbm>. (Acceso el día 07/01/02).



- Van Houtert, M. F. J. 1993. The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 43:189-225.
- Van Soest. P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Second Edition. Comstock Publishing associates. Cornell University Press. USA.
- Varga, G. A., and E. S. Kolver. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. Conference: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants. *J. Nutr.* 127:819S-823S.
- Varga, G. A., W. H. Hoover, L. L. Junkins, and B. J. Shriver. 1988. Effects of urea and isoacids on *in vitro* fermentation of diets containing formaldehyde-treated or untreated soybeanmeal. *J. Dairy Sci.* 71:737-744.
- Veira, D. 1986. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *J. Anim. Sci.* 63:1547-1560.
- Wallace, R. J. 1992. Manipulation of rumen function: Ionophores, yeast culture and biotechnology. Pages 193-203 in *Biotechnology in the Feed Industry*. T. P. Lyons (ed). Alltech Technical Publications. Nicholasville, KY.
- Wallace, R. J. 1994. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: Progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72:2992-3003.
- Wallace, R. J. 1996. Ruminant microbial metabolism of peptides and amino acids. Conference: Altering ruminant nitrogen metabolism to improve protein utilization. *J. Nutr.* 1326S-1335S.
- Wallace, R. J., and M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pages 217-249 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson (ed). Elsevier Applied Science. London, England.

- Wallace, R. J., J. W. Czerkawski, and G. Breckenridge. 1981. Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 46:131-148.
- Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. *J. Dairy Sci.* 79:1496-1502.
- Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, and D. R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:122-134.
- Weller, A. F., and R. A. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32:341-351.
- Whitehouse, C. G. Schwab, and W. R. Chesbro. 1992. Effect of washing fluid-associated bacteria mixed microorganisms (FAM) and fluid-associated bacteria (FAB) with saline or different concentrations of methanol in distilled water. In: Problems associated with isolation of ruminal microorganisms and variation in their chemical composition. Mini-symposium on "Methods to measure microbial protein synthesis". Baltimore, M. D.
- Woodford, S. T., and M. R. Murphy. 1988. Effect of forage physical form on chewing activity, dry matter intake, and rumen function on dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 71:674-686.
- Yang, C. M. J., and J. B. Russell. 1993. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation *in vivo* and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.* 71:3470-3476.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2736-2746.
- Zinn, R. A., and F. N. Owens. 1983. Influence of feed intake level on site of digestion in steers fed a high concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 56:471-475.

## CAPÍTULO 2

Efecto del tipo de dieta y la dosis de REGEPRO<sup>®</sup> sobre la fermentación microbiana y el flujo de Nutrientes en un sistema de cultivo continuo de flujo doble

**Effect of type of diet and the REGEPRO<sup>®</sup> dose on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a dual flow continuous culture system**

## Effect of type of diet and the REGEPRO<sup>®</sup> dose on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system

**ABSTRACT:** Eight dual-flow continuous culture fermenters (1,320 mL) were used in three consecutive periods to study the effects of type of diet and dose of **Regepro<sup>®</sup>** (RP) on microbial fermentation and nutrient flows. Treatments were arranged in a 2 x 4 factorial, being the main factors diet (**CS** = Corn Silage; **RS** = Ryegrass Silage based diets) and RP dose (0, 0.15, 0.30, and 0.45 g of RP/100 g DM diet) the main factors. Temperature (39°C), pH (6.4), liquid (10%/h) and solid (5%/h) dilution rates, and intake (100 g DM/d) were maintained constant. Each period consisted of 5 d for adaptation and 3 d for sampling. Samples from diets, effluents and bacteria were taken for chemical analysis. The CS diet had higher CP (19.3 vs 17.5%) and lower NDF (35.3 and 39.0%) concentrations compared with RS diet. True DM digestibility tended to be higher ( $P < 0.10$ ) in CS compared to RS diet, but only when solid (SAB) instead of liquid (LAB) associated bacteria were used for calculations. Total volatile fatty acid (VFA) concentration was higher in CS (117.9 mM) compared with RS (105.5 mM). The proportion of butyrate and branched chain VFA tended to be lower in CS compared with RS diet. The ammonia N concentration and flow, and the total N flow were higher ( $P < 0.05$ ) in CS compared to RS diet. The RP dose did not affect estimates of DM, OM, fiber digestion, and VFA concentration and profile, although there was a numerical trend for a quadratic effect of RP dose on the acetate to propionate ratio. The RP dose reduced ammonia N concentration and flow linearly ( $P < 0.10$ ), and the effect was more pronounced at intermediate doses of RP (0.15 and 0.30 g of RP/100 g DM diet) and for RS diet. The bacterial

composition data indicated higher N and purine bases content ( $P < 0.05$ ) in LAB compared with SAB. The calculated true OM digestibility was higher ( $P < 0.05$ ) and DM digestibility tended to be higher ( $P < 0.10$ ) when SAB instead of LAB were used for calculations. The RP reduced ammonia N concentration in the intermediate doses of RP without no other effects on nutrient digestibility, microbial fermentation profile or efficiency of microbial protein synthesis.

**Key words:** Regepro®, silage, microbial fermentation

## **Introduction**

Current feeding system for ruminants protein nutrition have evolved from simplistic approaches, based on CP of diet (NRC, 1978; INRA, 1978), to more complex system where ruminal CP degradation and amino acids supply to the small intestine are considered (INRA, 1988; O'Connor *et al.*, 1993; NRC, 2001). The major motivation for these developments was the improvement of the efficiency of nitrogen utilization to reduce costs and improve milk production. While this approach is in itself of great importance to animal production systems, there has been recent interest evolving out of two different, but critically important, issues for the future of the bovine production systems: a) The impact of excess nitrogen supply on animal health and reproductive performance (Ferguson *et al.*, 1993), and b) The impact of excess nitrogen in environmental pollution. Dairy cattle farming is an important contributor to environmental pollution in general, and of N in particular (Berentsen *et al.*, 1992; Tamminga, 1992; Castillo *et al.*, 2000). Khon *et al.* (1997) indicated that proper feeding and management strategies were the most cost-effective methods of reducing environmental N pollution in dairy cattle farms.

There are several methods used in cattle diets to improve protein utilization and reduce N losses (Broderick *et al.*, 1991; Castillo, 2000). Some of them include chemical or heat treatment of protein supplements to reduce protein degradation. However, these methods may overprotect protein and reduce its

intestinal digestibility (Calsamiglia *et al.*, 1995). Other products, as ionophores, have been used to reduce AA deamination and ammonia accumulation in the rumen (Dinius *et al.*, 1976; Van Nevel and Demeyer, 1988). However, the reduction in ammonia N concentration usually occur together with other changes on microbial activity or fermentation profile (Van Nevel and Demeyer, 1988; Russell and Strobel, 1989; Ruiz *et al.*, 2001). The reduction in N availability for microbial growth may limit microbial protein synthesis. Therefore, the evaluation of the effects of this type of additives that modify N availability in the rumen needs the determination of their overall effect on rumen fermentation and microbial protein synthesis. These studies need to be conducted *in vivo* or in continuous fermentation systems, and require the isolation of rumen microbes and the use of microbial markers (Stern *et al.*, 1994). Most research has been conducted using the microbial population associated with the liquid fraction (LAB) of the rumen content, although the largest proportion (80%) of the rumen microbial population is attached to feed particles (Craig *et al.*, 1987; Olubobokun *et al.*, 1988). Several studies indicated that chemical composition of liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria differ (Olulobokun *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 2000). Such differences may be responsible for errors in the prediction of the flow of microbial protein or other variables related to N metabolism in ruminants.

The objective of this experiment was to determine the effect of the additive Regepro<sup>®</sup> on microbial fermentation and nutrient flow in two different diets in continuous culture of rumen fluid, with the main emphasis placed on N metabolism and utilization, using the chemical composition of LAB and SAB.

## **Materials and Methods**

### *Continuous Culture System, Diets and Treatments*

Eight 1,320 mL dual flow continuous culture fermenters (Hoover *et al.*, 1976) were used in three consecutive periods of eight days each. Fermenters were inoculated with rumen fluid strained through four layers of cheesecloth

taken from two ruminally cannulated cows fed a 50 to 50 forage to concentrate diet. The experimental diets were corn silage (**CS**) and ryegrass silage (**RS**) based (Table 1), and were formulated to meet or exceed NRC (2001) requirements for lactating dairy cows producing 30 kg of milk. A total of 100 g/d of DM diet were fed continuously throughout the day to the fermenters. Temperature was maintained constant (39°C) and pH was controlled at 6.4 by infusion of 3N HCl or 5N NaOH. Anaerobic conditions were maintained by infusion of N<sub>2</sub> at a rate of 40 mL/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into flasks and contained 0.4 g/L of urea to simulate recycled N. Liquid and solid dilution rates were maintained at 10 and 5%/h, respectively.

Table 1. Ingredients and chemical composition of the diets

Item	Diet	
	Corn silage	Ryegrass silage
Ingredients, % of DM		
Corn silage	58.3	--
Ryegrass silage	--	42.1
Ryegrass hay	--	5.3
Alfalfa hay	12.1	--
Wheat grain	--	15.8
Soybean meal	4.2	7.9
Beet pulp	19.0	10.5
Minerals and vitamins	2.3	2.6
Chemical composition, % of DM		
OM	91.7	91.5
CP	19.3	17.5
NDF	35.3	39.1
ADF	18.2	20.0

Treatments were arranged as a 2 x 4 factorial, being diet (**CS** and **RS** based diet) and dose of **Regepro**<sup>®</sup> (**RP** = 0, 0.15, 0.30, and 0.45 g of RP/100 g DM diet) the main factors. Treatments were the combinations of type of diet and RP dose: CS0, CS15, CS30, CS45, RS0, RS15, RS30, and RS45, respectively. Treatments were randomly assigned within period to fermenter units.

#### *Sample Collection and Bacterial Detachment Procedure*

Each experimental period consisted of five days for adaptation and three days for sampling. During sampling days, collection vessels were maintained at 4°C to retard microbial growth. Solid and liquid effluent content were mixed and homogenized for 1 min, and a 500 mL sample was removed via aspiration. Upon completion of each period, effluents from the three sampling days were composited and mixed within fermenter. Three subsamples of mixed effluent were taken, two of them were acidified with either HCl (4 mL effluent in 4 mL 0.2N HCl) or H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (4 mL effluent in 1 mL of 0.2% ClHg, 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.2% 4-methyl valerate) and frozen until analyzed for ammonia N and volatile fatty acid (VFA) concentrations, respectively. A third subsample was taken in triplicate for total N analysis. Two 250-mL subsamples of each composited sample were freeze-dried, ground through a 1-mm screen and analyzed for DM, ash, fiber, and purine bases content.

The SAB and LAB associated bacteria were obtained from the fermenter the last day of each experimental period. The LAB were obtained by filtration of fermenter flask contents through two layers of cheesecloth. The solid fraction was washed with saline solution (0.85% wt/vol NaCl, in a 3 to 1 saline solution to solid fraction proportion) to remove residual bacteria of the liquid fraction (Olubobokun and Craig, 1990), and the filtrate was added to the LAB preparation. The filtrate was centrifuged for 10 min at 1,000 x g to remove feed residues. The supernatant fraction was centrifuged twice for 20 min at 20,000 x g to isolate LAB, and washed twice (once with saline solution and a second time with distilled



water to reduce mineral contamination of the sample). The final bacterial pellet was freeze-dried for subsequent analysis.

The SAB were obtained by using a combination of several detachment procedures (Whitehouse *et al.*, 1994). The treatments were selected to obtain the maximum detachment of adherent bacteria and the use of chemical (alcohol, formaldehyde, acids) or physical (homogenization) treatments were avoided to prevent changes in microbial cell integrity. The fermenter solid residue combined with the feed residue pellet obtained in the first centrifugation of the LAB separation procedure was suspended in a saline solution with 0.1% methylcellulose (proportion 3 to 1 saline solution to solid-fraction ratio), and incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 min to remove attached bacteria (Minato and Suto, 1978). After the incubation, samples were refrigerated for 24 h at 4 °C, and solid residues were agitated for one hour with marbles (30 2-mm and 15 4-mm diameter marbles) to dislodge loosely attached bacteria. Finally, the solid fraction was filtered through cheesecloth and washed three times with saline solution. The SAB were obtained by differential centrifugation as in the LAB isolation procedure.

### *Sample Analyses*

The DM, ash and N content in feed, bacteria and effluents in diets were determined according to AOAC (1990). The NDF and ADF concentrations in feed and effluents were determined sequentially (Van Soest *et al.*, 1991). The ammonia N was determined by a colorimetric procedure (Chaney and Marbach, 1962). The VFA concentrations in deproteinised effluent fluid samples were determined by gas chromatography (GLC Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using 4-methylvaleric as internal standard (Jouany, 1982). Purine bases (adenine and guanine) in bacteria and effluent samples were determined by HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using allopurinol as internal standard (Balcells *et al.*, 1992).

### Statistical Analyses

Data was analyzed as a completely randomized block design with a 2 x 4 factorial arrangement of treatments (Steel and Torrie, 1988). Treatments were randomized into each period. The three periods were considered as blocks, and each individual fermenter served as the experimental unit. The statistical model was:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + D_j + RP_k + (D \times RP)_{jk} + \varepsilon_{ijkl},$$

where  $\mu$  was the mean, B was the period as block, D and RP were diet and **Regepro**<sup>®</sup> dose effects, and D x RP was the diet by **Regepro**<sup>®</sup> dose interaction. Microbial fermentation profile and nutrient flow data were analyzed using the PROC GLM procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, 1988). Least square mean difference test was used to compare treatment means. Orthogonal contrast were used to determine if dose had linear or quadratic effects on the parameter measured. The differences between the bacterial fractions (LAB and SAB) were analyzed as a paired t-test comparison (Steel and Torrie, 1988) using the PROC MEANS procedure of SAS.

### Results and Discussion

The nutrient content of CS and RS diet is presented in Table 1. Concentrations of CP in experimental silages were higher than expected due the higher quality of forages (13.0 and 15.8%) for corn and ryegrass silage, respectively. The NDF content was higher for ryegrass (50.0%) than for corn (44.9%) silage. Concentration of CP was higher and that of NDF and ADF was lower in CS compared to RS diet.

There were no significant interactions between diet type and RP dose. Therefore, only main effects are presented and discussed, unless otherwise indicated.

### *Digestibility Coefficients*

The apparent DM digestibility was higher ( $P < 0.05$ ) in CS compared to RS diet (Table 2). The true DM digestibility (TDMD) tended to be higher ( $P < 0.10$ ) in CS compared to RS diet, but only when SAB instead of LAB were used for calculations. Therefore, the interpretation of the results was dependent of the microbial population used as reference. There were no effects of type of diet on apparent and true OM (TOMD), or ADF digestibilities. In spite of the differences in chemical composition of diets (Table 1), the results indicate that the two diets resulted in similar nutrient digestibilities, and are in agreement with results of Bernard *et al.* (2002), who reported a higher apparent DM digestibility, and no differences in fiber digestibility when all dietary forage was provided by RS or CS in diets used for lactating dairy cows.

The level of inclusion of RP in diets did not affect the digestibility of DM, OM, or fiber (Table 2). It has been observed that the inclusion of other feed additives as ionophores, which have a potential use in dairy cattle (McGuffey *et al.*, 2001), results in a dose dependent depression of DM, OM or fiber digestion *in vitro* (Jalc *et al.*, 1992) and *in vivo* (Faulkner *et al.*, 1998). More information is needed to fully evaluate the potential use of **Regepro**<sup>®</sup> in dairy cattle diets in the European countries.

### *Effects on Ruminal Fermentation*

*Volatile Fatty Acids Production and Profile.* Total VFA production was higher in CS compared to RS diet (Table 3), reflecting the higher digestion of DM (Table 2) and the higher fermentability of carbohydrates present in the diet. The molar proportion of butyrate and that of branched chain VFA tended to be lower ( $P < 0.10$ ) in CS compared to RS diet. Since the molar proportion of acetate was similar among diets, the observed difference in the molar proportion of butyrate suggest that in RS diet the fermentation pattern favored an increase in the synthesis of butyrate derived from hexose fermentation (Van Houtert, 1993).

Table 2. Effect of diet type and **Regepro**<sup>®</sup> dose on apparent and true DM, OM, and ADF digestion in continuous culture

Item	Diet <sup>a</sup>		SEM <sup>b</sup>	<b>Regepro</b> <sup>®</sup> dose				SEM	Effect (P < ) <sup>c</sup>		
	CS	RS		0	0.15	0.30	0.45		Diet	RPL	RPQ
Apparent digestibility, %											
DM	36.4	33.9	0.70	35.3	35.3	34.3	35.6	0.98	*	NS	NS
OM	31.0	30.2	0.63	30.5	31.1	29.7	31.3	0.88	NS	NS	NS
True digestibility <sup>d</sup> , %											
DM <sub>LAB</sub>	52.6	50.1	0.82	52.2	51.2	51.3	50.7	1.16	NS	NS	NS
DM <sub>SAB</sub>	53.5	51.0	0.89	52.8	52.5	52.1	51.6	1.26	†	NS	NS
OM <sub>LAB</sub>	47.1	46.2	0.82	47.1	46.8	46.4	46.2	1.16	NS	NS	NS
OM <sub>SAB</sub>	48.2	47.4	0.83	48.2	48.2	47.5	47.3	1.17	NS	NS	NS
ADF digestibility, %	41.1	41.1	1.91	40.6	39.1	41.9	42.7	2.71	NS	NS	NS

<sup>a</sup> CS = Corn silage based diet; RS = Ryegrass silage based diet.

<sup>b</sup> Standard error of the mean.

<sup>c</sup> Diet = Diet effect; RP = **Regepro**<sup>®</sup> dose effect: L = linear, Q = quadratic; NS = not significant; † P < 0.10; \* P < 0.05.

<sup>d</sup> Using liquid (LAB) or solid (SAB) associated bacteria.

The molar proportion of branched chain VFA was higher in RS diet, suggesting that the protein was more degraded in this type of diet, because the branched chain VFA are derived from protein catabolism in the rumen (Mackie and White, 1990). Some authors suggested that a higher availability of branched chain VFA stimulate growth of cellulolytic bacteria (Bryant, 1973) and fiber digestion *in vitro* (Stern *et al.*, 1985; Gorosito *et al.*, 1985). However, evidence for this favorable effect has been obtained only *in vitro* with purified diet (Hume, 1970). Although other authors have also indicated that supplementing ruminant diets with these growth factors when available true protein is low (Russell *et al.*, 1990), or when deamination step is inhibited (Brodisco and Jouany, 1995), may enhance the efficiency of microbial growth, the effect of ruminal branched chain VFA concentration or supplementation in common diets is negligible.

There were no effects of RP dose on the total VFA production and profile, although there was a numerical trend ( $P < 0.22$ ) for a quadratic effect of RP dose on the acetate to propionate ratio (Table 3), and the effect was more evident in the CS diet compared to RS diet (Figure 1). The trend in the intermediate doses of RP (0.15 and 0.30 g/100 g DM) suggests that there was an improvement in the fermentation profile that would support a higher milk fat content, related with an increase in the acetate and a decrease in the propionate concentration. These observations suggest that the mode of action of RP on the acetate to propionate ratio may be different for the other feed additives used in ruminant diets as ionophores (MgGuffey *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2001) or probiotics (Miller-Webster *et al.*, 2002), where the fermentation profile shifts towards propionic acid production.

*Nitrogen metabolism.* The effects of diet type and RP dose on N metabolism are presented in Table 4. Dietary and microbial N flow, protein degradation, and the efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) were estimated using the chemical composition of LAB and SAB independently.

Table 3. Effect of diet type and **Regepro**<sup>®</sup> dose on volatile fatty acid production and profile by mixed ruminal bacteria in continuous culture

Item	Diet <sup>a</sup>		SEM <sup>b</sup>	<b>Regepro</b> <sup>®</sup> dose				SEM	Effect (P < ) <sup>c</sup>		
	CS	RS		0	0.15	0.30	0.45		Diet	RPL	RPQ
Total VFA, mM	117.9	105.5	1.93	112.2	109.3	112.4	113.1	2.73	**	NS	NS
Individual VFA, %											
Acetate	58.0	58.4	1.60	57.2	59.4	59.2	57.1	2.26	NS	NS	NS
Propionate	22.6	21.4	1.36	22.7	20.3	21.6	23.4	1.93	NS	NS	NS
Butyrate	12.5	13.7	0.43	13.6	13.3	12.6	12.9	0.61	†	NS	NS
Iso-Butyrate	0.98	0.87	0.04	0.90	0.96	0.92	0.93	0.05	†	NS	NS
Valerate	3.44	3.75	0.30	3.63	3.27	3.84	3.65	0.43	NS	NS	NS
Iso-Valerate	2.40	1.86	0.22	1.95	2.69	1.79	2.10	0.31	†	NS	NS
Branched chain VFA	2.38	2.74	0.25	2.85	3.64	2.71	3.02	0.35	†	NS	NS
Acetate to propionate ratio	2.79	2.77	0.23	2.58	3.03	2.94	2.58	0.32	NS	NS	NS

<sup>a</sup> CS = Corn silage based diet; RS = Ryegrass silage based diet.

<sup>b</sup> Standard error of the mean.

<sup>c</sup> Diet = Diet effect; RP = **Regepro**<sup>®</sup> dose effect: L = linear, Q = quadratic; NS = not significant; † P < 0.10; \*\*P < 0.01.

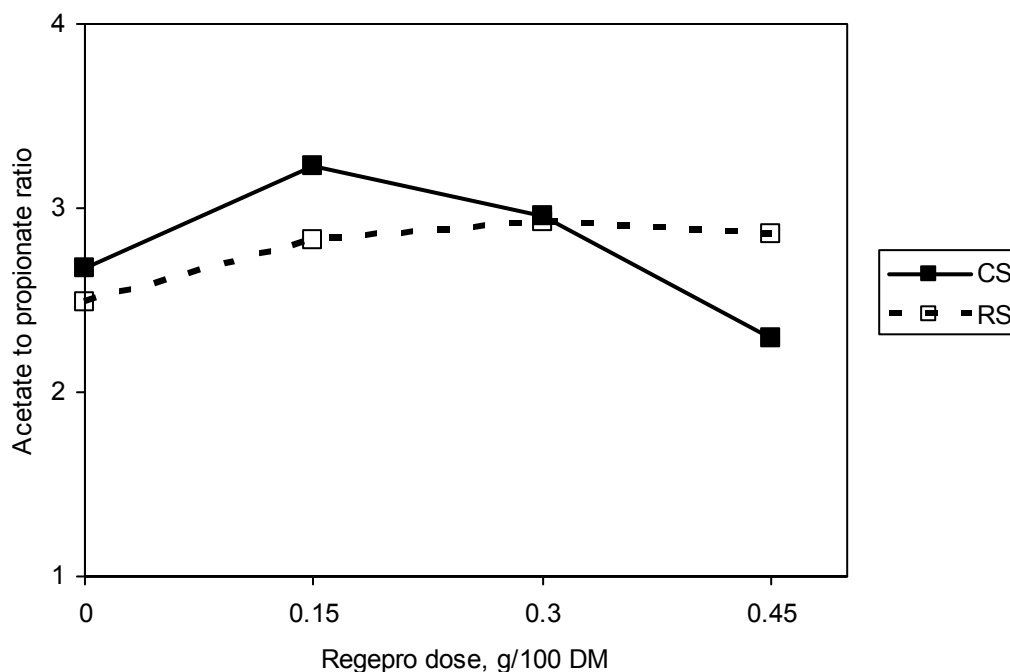


Figure 1. Effect of type of diet and **Regepro**<sup>®</sup> dose on acetate to propionate ratio in continuous culture

The ammonia N concentration (mg/100 mL), and total and ammonia N flow (g/d) were higher in CS compared to RS diet ( $P < 0.05$ ), which was expected due to the higher total CP content of the CS diet (Table 1), and indicated that a higher amount of protein was degraded to ammonia. The ammonia N concentration was above the 5 mg/dL (Satter and Slyter, 1974) or 10 mg/dL (Van Soest, 1994) suggested to be necessary to maintain microbial growth, suggesting that N availability did not limit microbial activity. However, excess of ammonia N concentrations may be related with important N losses, resulting in a higher risk of environmental N pollution (Castillo *et al.*, 2000).

The RP dose reduced ammonia N concentration and flow linearly ( $P < 0.10$ ). The reduction in ammonia N concentration was more pronounced at intermediate doses of RP (0.15 and 0.30 g/100 g DM) and for RS diet (Table 4, Figure 2). There were no effect of diet type or RP dose on dietary or bacterial N

flows, protein degradation or efficiency of microbial protein synthesis (EMPS), and results were independent of microbial population estimates used for calculations (Table 4). Protein degradation was numerically higher in CS compared to RS diets. The lack of significance may be attributed to the larger standard error observed for these estimates.

The average reduction of 18% in the ammonia N concentration across both type of diets at the RP dose 0.3 g RP/100 g DM should be considered a successful decrease, not only for the magnitude of the reduction, but because no other negative effects on protein degradation, microbial fermentation profile or EMPS were observed. This finding suggest that the inclusion of moderate dose of RP may be related to changes in the deaminative activity, more than a global decrease in the proteolytic activity or microbial efficiency. This mode of action on the ammonia N decreases may be different to the other feed additives as ionophores (Van Nevel and Demeyer, 1988; Russell and Strobel, 1989). Research to characterize the effect of the ionophore monensin on the N metabolism showed that a decrease in ammonia N concentration was accompanied by a decrease in CP degradation and ruminal microbial protein synthesis both *in vitro* and *in vivo* (McGuffey *et al.*, 2001). Yang and Russell (1993a, b) demonstrated *in vivo* that the decrease in rumen ammonia N caused by monensin was associated with a significant decrease in ruminal bacteria that use amino acids and peptides as an energy source for growth. Finally, it should be kept in mind that a decrease in the ammonia N concentration observed with the use of some feed additives or protected protein, usually occur together with a negative effect on microbial activity or fermentation profile due to either: a) the effect of the additive on the other microbial groups involved in energy utilization (reduction in digestibility), and/or; b) the excessive reduction in ammonia N concentration below the optimal level, was detrimental to microbial growth.

Chemical composition of LAB and SAB (Table 5) indicates differences in N and purine content, being higher in LAB compared with SAB. However, the N to purine ratio was not different between microbial populations.



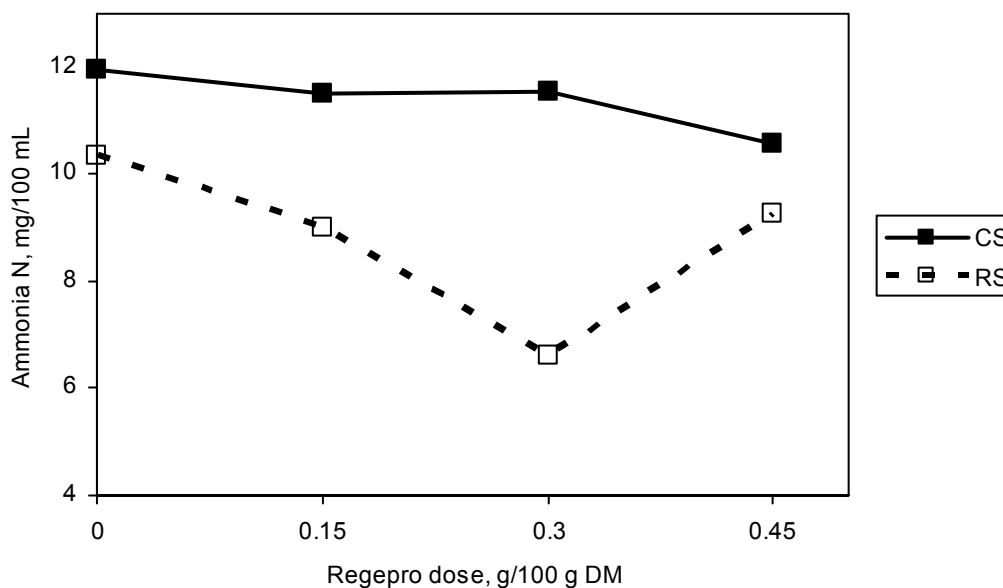


Figure 2. Effect of diet type and **Regepro**<sup>®</sup> dose on ammonia N concentration in continuous culture

The TOMD estimate was higher ( $P < 0.05$ ) and TDMD tended to be higher ( $P < 0.10$ ) when SAB instead of LAB were used for calculations, but there were no effect of using LAB or SAB composition data on the microbial protein synthesis or EMPS estimates. The OM content was not different between LAB and SAB, which agree with results of Cecava *et al.* (1990), who reported that the OM content of different bacterial fractions was similar (83% of DM), but disagree with results of other authors (Olulobobun *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 2000), who indicated higher OM content in SAB than in LAB. The higher mean N content and marker concentration in LAB than in SAB observed in this study were already reported by other authors in several studies (Martín *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001).

Table 4. Effect of diet type and **Regepro**<sup>®</sup> dose on nitrogen metabolism of ruminal microorganisms in continuous culture

Item	Diet <sup>a</sup>		SEM <sup>b</sup>	<b>Regepro</b> <sup>®</sup> dose				SEM	Effect (P < ) <sup>c</sup>		
	CS	RS		0	0.15	0.30	0.45		Diet	RPL	RPQ
NH <sub>3</sub> N, mg/100mL	11.4	8.8	0.38	11.1	10.3	9.1	9.9	0.55	**	†	NS
Total N flow, g/d	3.26	3.14	0.03	3.21	3.24	3.17	3.17	0.05	*	NS	NS
NH <sub>3</sub> NfFlow, g/d	0.35	0.27	0.01	0.35	0.32	0.28	0.31	0.02	**	†	NS
NA N flow, g/d	2.90	2.86	0.03	2.86	2.92	2.88	2.86	0.05	NS	NS	NS
Dietary N flow, g/d											
LAB <sup>d</sup>	1.42	1.44	0.07	1.39	1.48	1.36	1.50	0.09	NS	NS	NS
SAB	1.38	1.41	0.07	1.37	1.44	1.36	1.44	0.09	NS	NS	NS
Bacterial N flow, g/d											
LAB	1.48	1.42	0.06	1.48	1.44	1.53	1.36	0.09	NS	NS	NS
SAB	1.50	1.45	0.07	1.50	1.48	1.52	1.42	0.09	NS	NS	NS
Protein degradation, %											
LAB	53.1	50.3	2.35	52.9	51.1	54.4	48.4	3.32	NS	NS	NS
SAB	53.8	51.3	2.46	53.6	52.4	54.0	50.3	3.48	NS	NS	NS
EMPS <sup>e</sup> , g/kg TOMD											
LAB	31.0	30.3	1.12	30.8	30.3	32.7	29.0	1.58	NS	NS	NS
SAB	30.8	30.4	1.10	30.8	30.4	31.7	29.4	1.56	NS	NS	NS

<sup>a</sup> CS = Corn silage based diet; RS = Ryegrass silage based diet.

<sup>b</sup> Standard error of the mean.

<sup>c</sup> Diet = Diet effect; RP = **Regepro**<sup>®</sup> dose effect: L = linear, Q = quadratic; NS = not significant; P < 0.10; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01.

<sup>d</sup> Using liquid (LAB) or solid (SAB) associated bacteria.

<sup>e</sup> Efficiency of microbial protein synthesis (g N/kg true organic matter digested).

Table 5. Differences between solid and liquid associated bacteria in continuous culture

Item	Bacteria <sup>a</sup>		SEM <sup>b</sup>	Effect <sup>c</sup> (P < )
	LAB	SAB		
Chemical composition				
MO, %	85.4	84.8	0.55	NS
Bacterial N, %	8.83	8.53	0.09	**
PB content <sup>d</sup>	209.7	193.4	6.04	*
N:PB <sup>e</sup>	23.6	22.7	0.63	NS
Parameter estimates				
TDMD <sup>f</sup> , %	51.4	52.3	0.47	†
TOMD <sup>g</sup> , %	46.6	47.8	0.49	*
Protein degradation, %	51.7	52.7	1.28	NS
Dietary N flow, g/d	1.43	1.40	0.04	NS
Bacterial N flow, g/d	1.45	1.48	0.04	NS
EMPS <sup>h</sup>	30.7	30.6	0.52	NS

<sup>a</sup> Mean value for solid (SAB) and liquid (LAB) associated bacteria.

<sup>b</sup> Standard error of the mean of differences SAB-LAB.

<sup>c</sup> NS = not significant; †  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

<sup>d</sup> Purine bases content ( $\mu\text{M/L}$ ).

<sup>e</sup> N:PB = % bacterial nitrogen to purine bases (Adenine+guanine /g DM) content, ratio.

<sup>f</sup> TDMD = True dry matter digestibility (g N/kg true organic matter digested).

<sup>g</sup> TOMD = True organic matter digestibility.

<sup>h</sup> Efficiency of microbial protein synthesis.

Differences in N and marker concentration between LAB and SAB may reflect differences in the stage of growth and nutrition of particular bacterial populations as well as varying bacterial species within different populations (Czerkawski, 1976; Legay-Carmier and Bauchart, 1989). The N to marker ratio is an important value required to estimate N microbial metabolism. However, there are very few comparisons of N metabolism estimates using LAB and SAB composition data. Stern et al (1994), based on some bibliographical data (using

diaminopimelic acid as microbial marker), showed that EMPS, ruminal protein degradation and bacterial N flows were approximately 30% greater using LAB than using SAB, and indicated that these differences highlight the variation that can occur from microbial isolation procedures utilized to harvest the bacteria. Probably, the similar N to microbial marker ratio observed in the present trial may explain the lack of effect of the microbial population used for calculation on the N metabolism estimates.

### **Implications**

Diet type had no effect on true DM and fiber digestion. The true DM digestion tended to be higher in corn silage compared to ryegrass silage based diet, but the effect was dependent on the microbial population used for calculations. Corn silage based diet had higher total VFA, and concentrations of butyrate and branched chain VFA tended to be lower compared with ryegrass silage based diet. The ammonia N concentration, and total and ammonia N flow were higher in corn silage compared to ryegrass silage based diet, but was directly related to the CP content of diets. There were no other effects of diet type or microbial population used for calculations on the N metabolism estimates. These differences were independent of intake, dilution rates or pH. The addition of Regepro<sup>®</sup> reduced the ammonia N concentration without changes in CP degradation, microbial protein synthesis, efficiency of microbial protein synthesis or fermentation profile, suggesting that N utilization was enhanced by ruminal microorganisms, and rumen N losses were reduced.

### **Literature Cited**

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Balcells, J. J., J. M. Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575:153-157.

- Bernard, J. K., J. W. West, and D. S. Trammel. 2002. Effect of replacing corn silage with annual ryegrass silage on nutrient digestibility, intake, and milk yield for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2277-2282.
- Berentsen, P. B. M., G. W. J. Giesen, and S. C. Verduyn. 1992. Manure legislation effects on income and on N, P and K losses in dairy Farming. *Liv. Prod. Sci.* 31:43-56.
- Broderick, G. A., R. J. Wallace, and E. R. Ørskov. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. Pages 541-592 in *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima (eds). Academic Press, Orlando, Fl. USA.
- Broudiscou, L., and J. P. Jouany. 1995. Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. *Reprod. Nutr. Dev.* 35:517-535.
- Bryant, M. P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed. Proc.* 32:1809-1813.
- Calsamiglia, S., M. D. Stern, and J. L. Firkins. 1995. Effects of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion in vitro. *J Anim. Sci.* 73:1819-1827.
- Castillo, A. R., E. Kebreab, D. E. Beever, and J. France. 2000. A review of efficiency of nitrogen utilization in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *J. Anim. Feed Sci.* 9:1-32.
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. C. Gay, and L. L. Berger. 1990. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency and isolation techniques. *J. Dairy Sci.* 73:2480-2488.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Craig, W. M., G. A. Broderick, and D. B. Ricker. 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* 117:56-62.

- Czerkawski, J. W. 1976. Chemical composition of microbial matter in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 27:621-632.
- Dinius, D. A., M. E. Simpson, and P. B. Marsh. 1976. Effect of monensin fed with forages on digestion and the ruminal ecosystem of steers. *J. Anim. Sci.* 42:229-234.
- Faulkner, D. B., T. J. Klopfenstein, T. N. Trotter, and R. A. Britton. 1988. Monensin effects on digestibility, ruminal protein escape and microbial protein synthesis on high-fiber diets. *J. Anim. Sci.* 66:552-558.
- Ferguson, J. D., D. T. Galligan, T. Blanchard, and M. Reeves. 1993. Serum urea nitrogen and conception rate: The usefulness of test information. *J. Dairy Sci.* 76:3742-3754.
- Hoover, W. H., P. H. Knowlton, M. D. Stern, and C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous culture of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:535-542.
- Hume, I. D. 1970. Synthesis of microbial protein in the rumen. II. A response to higher volatile fatty acids. *Aust. J. Agric. Res.* 21:297-304.
- Gorosito, A. R., J. B. Russell, and P. J. Van Soest. 1985. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on digestion of plant cell *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 68:840-847.
- Institut National de la Recherche Agronomique. 1978. Alimentation des ruminants. INRA. 78000. Versailles, France.
- Institut National de la Recherche Agronomique. 1988. R. Jarrige (ed). Alimentation des bovins, ovins et caprins. Paris, France.
- Jalc, D., M. Baran, T. Vendrak, and P. Siroka. 1992. Effect of monensin on fermentation of hay and wheat bran investigated by the rumen simulation technique (Rusitec). Basal parameters of fermentation. *Arch. Tierernahr.* 42:147-152 (Abstr).

- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobics fermentor content. *Sci. Aliments* 2:131-144.
- Khon, R. A., Z. Dou, J. D. Ferguson, and R. C. Boston. 1997. A sensitivity analysis of nitrogen losses from dairy farms. *J. Environ. Management*. 50:417-428.
- Legay-Carmier, F., and D. Bauchart. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. *Br. J. Nutr.* 61:725-740.
- Mackie, R. I., and B. A. White. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *J. Dairy Sci.* 73:2971-2995.
- Martin, C., A. G. Williams, and B. Michalet-Doreau. 1994. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal content. *J. Anim Sci.* 72:2962-2968.
- McGuffey, R. K., L. F. Richardson, and J. I. D. Wilkinson. 2001. Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. *J. Dairy Sci.* 84(E. Suppl.):E194-E203.
- Minato, H., and T. Suto. 1978. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder *in vitro* and elution of bacteria attached thereform. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24:1-16.
- Miller-Webster, T., W. H. Hoover, and M. Holt. 2002. Influence of Yeast Culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 85:2009-2014.
- National Research Council. 1978. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 5<sup>th</sup> edition. National Academic Press, Washington, DC.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> edition National Academic Press, Washington, DC.

- O'Connor, J. D., C. J. Sniffen, D. G. Fox., and W. Chalupa. 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV Predicting amino acid adequacy. *J. Dairy Sci.* 71:1298-1311.
- Olubobokun, J. A., and W. M. Craig. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 68:3360-3370.
- Olubobokun, J. A., W. M. Craig, and W. A. Nipper. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 66:2701-2710.
- Pérez, J. F., J. Balcells, M. Fondevila, and J. A. Guada. 1998. Composition of liquid- and particle-associated bacteria and their contribution to the rumen outflow. *Aus. J. Agric. Res.* 49:907-914.
- Rodríguez, C. A., J. González, M. R. Alvir, J. L. Repetto, C. Centeno, and F. Lamrani. 2000. Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. *Br. J. Nutr.* 84 :369-376.
- Ruiz, R., G. L. Albrecht, L. O. Tedeschi., G. Jarvis, J. B. Russell, and D. G. Fox. 2001. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. *J. Dairy Sci.* 84:1717-1727.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environm. Microbiol.* 55:1-6.
- Russell, J. B., H. J. Strobel, and G. Chen. 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Appl. Environm. Microbiol.* 54:8772-8777.
- Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1988. *Bioestadística: principios y prodecimientos*. 2ª Edición. McGraw-Hill. USA.



- Stern M. D., W. L. Blake, S. M. Hannah, A. Ruberti, and D. E. Otterby. 1985. Influence of branched chain volatile fatty acids on fiber digestion in continuous culture of rumen content. *J. Anim. Sci. (Suppl.)*59:449.
- Stern, M. D., G. A. Varga, J. H. Clark, J. L. Firkins, J. T. Huber, and D. L. Palmquist. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 77:2762-2786.
- Tamminga, S. 1992. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.* 75:345-357.
- Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer. 1988. Manipulation of rumen fermentation. Pages 387-444 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson (ed). Elsevier, Amsterdam.
- Van Houtert, M. F. J. 1993. The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 43:189-225.
- Van Soest. P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Second Edition. Comstock Publishing associates. Cornell University Press. USA.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3588-3597.
- Weller, R. A., and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32:341-351.
- Whitehouse, N. L., V. M. Olson, C. G. Schwab, W. R. Chesbro, K. D. Cunningham, and K. D. Lycos. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72:1335-1343.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2736–2746.

### CAPÍTULO 3

Efectos del nivel de fibra y el tamaño de partículas sobre la fermentación microbiana y el flujo de aminoácidos de origen microbiano en un sistema de cultivo continuo

**Effects of fiber content and particle size on microbial fermentation and amino acid flow from microbial origin in a continuous culture system**  
**(Summited, J. Anim. Sci.)**

## Effects of fiber content and particle size on microbial fermentation and amino acid flow from microbial origin in a continuous culture system

**ABSTRACT:** Eight dual-flow continuous culture fermenters (1,320 mL) were used in two consecutive periods to study the effects of fiber content and particle size on microbial fermentation and AA flow from microbial origin. Treatments were arranged in a 2 x 2 factorial, main factors being fiber content (HF: 67% alfalfa hay, 33% concentrate; LF: 39% alfalfa hay, 61% concentrate) and particle size (LS:  $\geq 3$  mm; SS:  $\leq 1$  mm). Diets (95 g of DM) were fed in four equal portions throughout the day. Each period consisted of 7 d for adaptation and 3 d for sampling. The last day of the experiment, liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria were isolated from each fermenter for chemical analysis. Microbial N and AA flows were estimated using LAB or SAB composition data. There were no effects of fiber content or particle size on true OM, or fiber digestibilities. Total VFA production was higher ( $P < 0.05$ ) for LF (122 mM) compared with HF (102 mM). The proportion of acetate was higher for HF (63.5%) compared with LF (58.2%). When SS was fed instead of LS, there was a reduction ( $P < 0.05$ ) in the acetate proportion (63.4 vs 58.3%, respectively) and in the acetate to propionate ratio (3.13 vs 2.41, respectively). There were no fiber content or particle size effects on ammonia-N concentration, and on total, ammonia, non-ammonia and dietary N flows, or on protein degradation, except for bacterial N flow that was higher, and dietary N flow that was lower in SS compared with LS when LAB were used for calculations. Efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) was affected by particle size when LAB were used for calculations, and by fiber content when SAB were used. Fiber content and particle size did not affect the flow (g/d) of essential, non-essential and most of the individual AA in effluents. The AA profile of LAB differed from SAB ( $P < 0.05$ ) in four out of 16 AA. The fiber

content and particle size had small effects on microbial AA profile and flows. However, the bacterial AA flow was higher in 13 out of 16 AA, when SAB instead of LAB were used for calculations. The effects of fiber content and particle size on fermentation pattern and AA flow and profile were independent of diet, pH, intake or dilution rates. Estimates of bacterial N flow, EMPS and AA profile and flows of microbial origin were dependent on the type of microbial population used for calculations. The representativeness of the microbial samples is essential for the accurate prediction of the AA flow from microbial origin.

**Key words:** Fiber, Particle Size, Amino Acids, Rumen

## **Introduction**

Feeding systems for dairy cattle (Rulquin and Vérité, 1993; O'Connor *et al.*, 1993; NRC, 2001) include the prediction of AA requirements and supply to the small intestine. Between 50 and 80% of the AA flowing to the small intestine are of microbial origin (Storm and Ørskov, 1984). There is a considerable evidence that the chemical composition (Clark *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1998) and the AA profile (Lallès *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996) of solid (SAB) and liquid (LAB) associated bacteria differ. Our first objective was to determine the effect of using LAB or SAB on the estimated flow of AA from microbial origin. The hypothesis was that if the AA profile of SAB and LAB are different, diets that would be favourable to the growth of SAB (high fiber and small particle to increase microbial attachment surface), or LAB (low fiber and large particle to reduce the microbial attachment surface) will affect the partial contribution of each bacterial fraction and, therefore, their estimated contribution to the supply of AA to the small intestine.

A second objective was to study the direct effect of fiber content and particle size on rumen microbial fermentation. Results from *in vivo* studies indicates that as the level of fiber in the diet decreases, ruminal pH, retention time and fiber digestibility also decreases. However, the reduction of fiber

digestibility cannot be attributed uniquely to the change in fiber content of the diet, because the effects are confounded. Similarly, while the reduction in particle size has been associated with an increase of fiber digestion due to higher surface for microbial attachment *in situ* (Nocek and Kohn, 1988), *in vivo* studies have reported lower fiber digestion, probably associated with the increase in passage rate and/or a reduction in pH due to lower rumination. The isolation of these main factors independently of other changes in rumen conditions is essential for mathematical modeling of rumen fermentation. In this context, the use of *in vitro* continuous culture system offers the opportunity to change the fiber content or particle size without affecting intake, pH or dilution rates.

The objective of this research was to study the effects of fiber content and particle size on ruminal fermentation and nutrient flow, and the profile and flow of AA from microbial origin using LAB or SAB composition data in a dual flow continuous culture system.

## Materials and Methods

### *Diets*

Four diets for lactating dairy cows were formulated with two levels of fiber content (HF = 67 to 33; LF = 39 to 61, alfalfa hay to concentrate ratio), and two fiber particle sizes (Large = LS:  $\geq 3$  mm; and Small = SS:  $\leq 1$  mm, Table 1). Diets were the combinations of the two main factors (HF LS = HF and LS; HF SS = HF and SS; LF LS = LF and LS; LF SS = LF and SS). The fiber source was early bloom alfalfa hay (*Medicago sativa*) which stems and leaves were separated. The leaves were ground at 0.8 mm. The stems were ground through a 3-mm sieve. The sample retained in a 3-mm sieve was divided in two equal parts. The first was considered as particle size  $\geq 3$  mm and the other was ground at 0.8 mm and totally passed through a 1-mm sieve. This fraction was considered as  $\leq 1$  mm. This process was conducted to guarantee that the composition of the two particle sizes of alfalfa stems were similar. The alfalfa hay was reconstituted as 38% leaves and 62% stems (Jarrige *et al.*, 1995).

Table 1. Ingredients and chemical composition of the diets

Item	Diet <sup>a</sup>			
	HFLS	HFSS	LFLS	LFSS
Ingredients, % DM				
Alfalfa hay				
Stem	41.6	41.6	24.1	24.1
Leaf	25.5	25.5	14.8	14.8
Corn grain, ground	23.9	23.9	47.2	47.2
Soybean meal	7.3	7.3	11.3	11.3
Minerals and vitamins	1.7	1.7	2.3	2.3
Chemical composition, % of DM				
DM	92.1	92.4	91.4	91.5
OM	90.6	90.9	92.1	92.5
CP	17.9	17.4	17.5	17.2
NDF	40.1	40.2	28.1	29.6
ADF	24.3	24.7	15.8	16.1
NFC <sup>b</sup>	31.9	34.0	45.0	44.0

<sup>a</sup> HFLS = High fiber content, large particle size; HFSS = High fiber content, small particle size; LFLS = Low fiber content, large particle size; LFSS = Low fiber content, small particle size.

<sup>b</sup> NFC: non fiber carbohydrates, calculated as 100 - (%CP + %ash + %NDF + %EE).

### Continuous Culture System

Eight 1,320-mL dual flow continuous culture fermenters (Hoover *et al.*, 1976) were used in two consecutive 10-d experimental periods. Fermenters were inoculated with ruminal fluid strained through 4 layers of cheesecloth taken from two ruminally cannulated cows fed a 50 to 50 forage to concentrate diet. Experimental diets were mixed daily and 95 g of DM were fed in four equal portions throughout the day. Temperature was maintained at 39 °C and pH was controlled at 6.4 ± 0.05 by infusion of 3N HCl or 5N NaOH. The system was well buffered at pH 6.4, and the average use of HCl or NaOH was of 12.0 and 12.5 mL, respectively. Anaerobic conditions were maintained by infusion of N<sub>2</sub> at a rate of 40 mL/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into flasks and contained 0.187 g/d of non protein nitrogen to simulate

recycled N. Liquid and solid dilution rates were maintained at 10 and 5%/h, respectively.

#### *Sample Collection and Bacterial Detachment Procedure*

Each experimental period consisted of 7 d for adaptation and 3 d for sampling. During sampling days, collection vessels were maintained at 4°C to prevent microbial growth. Solid and liquid effluent content were homogenized for 1 min, and a 500 mL sample was removed via aspiration. Upon completion of each period, effluents from the three sampling days were composited and mixed within fermenter. Three subsamples of mixed effluent were taken, two of them were acidified with either HCl (4 mL effluent in 4 mL 0.2N HCl) or H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (4 mL effluent in 1 mL of 0.2% ClHg, 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.2% 4-methyl valerate) and frozen until analyzed for ammonia-N (NH<sub>3</sub> N) and VFA concentrations, respectively. A third subsample was taken in triplicate for total N analysis. Two 250-mL portions of each composited sample were freeze-dried, ground through a 1-mm screen and used for DM, ash, NDF, ADF, purine bases and AA analysis.

Solid (SAB) and liquid (LAB) associated bacteria were obtained the last day of each experimental period. The LAB were obtained by filtration of fermenter flask contents through two layers of cheesecloth. The solid fraction was washed with saline solution (0.85% wt/vol NaCl, in a 3 to 1 saline solution to solid fraction proportion) to remove residual bacteria of the liquid fraction (Olubobokun and Craig, 1990), and the filtrate was added to the LAB preparation. The filtrate was centrifuged for 10 min at 1,000 x g to remove feed residues. The supernatant fraction was centrifuged twice for 20 min at 20,000 x g to isolate LAB, and washed twice (once with saline solution and another time with distilled water to reduce mineral contamination of the sample). The final bacterial pellet was freeze-dried for subsequent analysis.

The SAB were obtained by using a combination of several detachment procedures (Whitehouse *et al.*, 1994) selected to obtain the maximum detachment without affecting cell integrity. The fermenter solid residue combined

with the feed residue pellet obtained in the first centrifugation of the LAB separation procedure was suspended in a saline solution with 0.1% methylcellulose (proportion 3 to 1 saline solution to solid-fraction ratio), and incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 min to remove attached bacteria (Minato and Suto, 1978). After the incubation, samples were refrigerated for 24 h at 4 °C, and solid residues were agitated for one hour with marbles (30 2-mm and 15 4-mm diameter marbles) to dislodge loosely attached bacteria. Finally, the solid fraction was filtered through cheesecloth and washed three times with saline solution. The SAB were obtained by differential centrifugation as in the LAB isolation procedure. The use of chemical (alcohol, formaldehyde, acids) or physical (homogenization) treatments (Whitehouse *et al.*, 1994) was avoided to prevent changes in microbial cell integrity or modification in their AA composition.

### *Sample Analyses*

The DM and ash content in feed, bacteria and effluents, and ether extract in diets were determined according to AOAC (1990). The NDF and ADF concentrations in feed and effluents were determined sequentially (Van Soest *et al.*, 1991). Total N in feed, effluents and bacterial samples were determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1990). The NH<sub>3</sub> N was determined by a colorimetric procedure (Chaney and Marbach, 1962). The VFA concentrations in deproteinized effluent fluid samples were determined by gas chromatography (GLC Hewlett Packard, Palo Alto, CA, Jouany, 1982) using 4-methylvaleric as internal standard. The purine bases (adenine and guanine) in bacteria and effluent samples were determined by HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using allopurinol as internal standard (Balcells *et al.*, 1992). Bacteria (1 mg) and effluent samples (5 mg) for AA analysis were hydrolyzed with 200 µL of 6 N HCl at 110°C for 24 h in sealed, evacuated tubes. Stability of methionine residues was achieved by adding mercaptoethanol as a reducing agent. Derivatization was conducted with 200 nmol per tube of dabsyl chloride at 70°C for 12 min. Amino acid analysis was performed by reverse-phase HPLC (Beckmann instruments, Palo Alto, CA), following the procedure of Vendrell and Avilés



(1986), and using norleucine as internal standard. A known mixture of AA and a standard protein (lisozyme, L-687, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) were processed in duplicate within each run to correct for AA losses during hydrolysis and AA analysis. Recovery rates were used to correct the AA content of bacteria and effluents.

### *Statistical Analyses*

Data was analyzed as a completely randomized block design with a 2 x 2 factorial arrangement of treatments (Steel and Torrie, 1988). The model used for each dependent variable was:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + F_j + S_k + (F \times S)_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$$

where  $\mu$  was the mean, B was the period as block, F was the fiber content effect, S was the particle size effect, and F x S their interaction.

Statistical analysis was conducted using SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Microbial fermentation profile and nutrient flow data were analyzed using the PROC GLM. Differences among means were tested by Tukey's multiple comparison test. The AA profile and flow of SAB and LAB were analyzed as a paired t-test (Steel and Torrie, 1988) using the PROC MEANS. Differences were declared at  $P < 0.05$ .

## **Results and Discussion**

### *Chemical Composition of the Diets*

Diets were isonitrogenous, and NDF and ADF levels were higher and non fiber carbohydrates lower in the HF diets compared with the LF diets, as expected (Table 1). The alfalfa fractionation and particle size reduction did not affect diet composition. Bowman and Firkins (1993) reported changes in nutrient composition with changes in feed particle size, which were probably due to the uneven distribution of small particles. The careful separation of leaves and

stems, and the complete grinding of well defined stem fractions in the present experiment prevented these differences from happening.

Because there were no interactions between fiber content and particle size ( $P > 0.10$ ), main effects are presented and discussed.

### *Digestibility Coefficients*

Fiber content did not affect true OM and fiber digestion, although it was numerically higher in LF (Table 2). In contrast, fiber digestion decreased *in vivo* as the content of fiber decreased in the diet (Bourquin *et al.*, 1994). In *in vivo* conditions, feeding low fiber diets results in a decrease in ruminal pH, and the cause of the decrease in fiber digestion is confounded between fiber level and pH (Hoover, 1986). In the present trial, the lack of effect of treatments on fiber digestion when pH was controlled suggests that the reduction in fiber digestion observed *in vivo* was due to changes in pH rather than a direct effect of fiber content.

Particle size did not affect the true digestion of OM or fiber (Table 2). *In vivo*, the reduction in particle size has often been related to a decrease in ruminal degradation of DM, probably due to a lower retention time of feed particles in the rumen, or to a decrease in pH (Grant *et al.*, 1990). In contrast, *in vitro* studies have shown that a reduction in particle size results in an increase in ruminal degradation of DM and fiber (Fahey *et al.*, 1993), which was attributed to an increase in the surface of action for microbial degradation (Bowman and Firkins, 1993), and the prevention of the changes in pH and dilution rates observed *in vivo*. In the conditions of the present experiment, it is likely that the control of pH and dilution rates resulted in no differences in OM and fiber digestion. These results suggest that most changes observed *in vivo* on OM and fiber digestion due to the content of fiber and particle size are mediated through changes in pH or dilution rates. Therefore, mechanistic models may predict accurately these effects by proper simulation of pH and dilution rate effects on nutrient digestion.

Table 2. Effects of fiber content and particle size of the diets on true OM, NDF and ADF digestion in continuous culture

Item	Fiber content <sup>a</sup>		Particle size <sup>b</sup>		SEM <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup> ( $P < $ )	
	HF	LF	LS	SS		F	S
True digestibility <sup>e</sup>							
OM <sub>LAB</sub> , %	44.1	46.2	45.6	44.7	3.43	NS	NS
OM <sub>SAB</sub> , %	46.6	47.9	47.6	46.9	4.45	NS	NS
Fiber digestibility							
NDF, %	27.9	30.0	31.6	26.3	8.08	NS	NS
ADF, %	26.7	27.6	30.2	24.0	8.08	NS	NS

<sup>a</sup> HF = High fiber content; LF = Low fiber content.

<sup>b</sup> LS = Large particle size; SS = Small particle size.

<sup>c</sup> Standard error of the mean.

<sup>d</sup> Fiber content (F) and particle size (S) effect: NS = not significant;

<sup>e</sup> Calculated using compositional data of liquid (LAB) or solid (SAB) associated bacteria.

### *Effects on Ruminal Fermentation*

**Volatile Fatty Acid Concentration.** Total VFA concentration was higher ( $P < 0.05$ ) in LF compared with HF (Table 3). *In vivo* (Bourquin *et al.*, 1994) and *in vitro* (Russell, 1998) studies reported that low fiber diets resulted in higher VFA concentration due to the greater rate of fermentation of starch compared with fiber. Molar proportion of acetate was higher, and that of branched-chain VFA lower, in HF compared with LF diets ( $P < 0.05$ ), and was consistent with previous reports (Bourquin *et al.*, 1994), as was the trend for lower acetate to propionate ratio in the LF diets ( $P < 0.10$ ; Siciliano-Jones and Murphy, 1989; Russell, 1998).

Total VFA concentration was not affected by particle size. However, the proportion of acetate, and the acetate to propionate ratio was higher in LS, and the butyrate concentration lower in LS compared with SS ( $P < 0.05$ ; Table 3). The increase in the surface for attachment in SS was expected to increase fiber digestion (Bowman and Firkins, 1993). Because fiber digestion results in an increase in acetate concentration, there is no obvious explanation for the lower acetate concentration in SS.

A reduction in the acetate to propionate ratio is often observed in *in vivo* experiments as a result of forage processing (Fahey *et al.*, 1993). This has been implicated as the reason for the reduction in milk fat percentage often observed when lactating dairy cattle consume processed forages (Shaver *et al.*, 1986). However, these observations *in vivo* are likely indirect effects of changes in pH. Grant *et al.* (1990) reported a reduction in the acetate to propionate ratio when cows were fed small particle forage, but the effect was attributed to the reduction of pH and the resulting increase in propionate. In the present experiment, the decrease in the acetate to propionate ratio in SS was due to a decrease in acetate. It should be noted that the decrease in acetate proportion in SS was parallel to an increase in the butyrate concentration, suggesting that in SS diets there was an increase in the conversion of acetate into butyrate.

Table 3. Effects of fiber content and particle size of the diets on volatile fatty acids in continuous culture

Item	Fiber content <sup>a</sup>		Particle size <sup>b</sup>		SEM <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup> ( <i>P</i> < )	
	HF	LF	LS	SS		F	S
Total VFA, mM	102.2 <sup>f</sup>	121.6 <sup>e</sup>	112.1	111.8	8.69	**	NS
Individual VFA, %							
Acetate	63.5 <sup>e</sup>	58.3 <sup>f</sup>	63.4 <sup>e</sup>	58.3 <sup>f</sup>	3.71	*	*
Propionate	21.5	25.2	22.2	24.5	4.53	NS	NS
Butyrate	10.9	11.8	9.9 <sup>f</sup>	12.9 <sup>e</sup>	1.39	NS	**
Iso-Butyrate	0.67	0.80	0.79	0.68	0.11	†	†
Valerate	2.45	2.32	2.48	2.30	0.18	NS	†
Iso-Valerate	1.05 <sup>f</sup>	1.62 <sup>e</sup>	1.28	1.39	0.41	*	NS
Branched-chain VFA	1.72 <sup>f</sup>	2.42 <sup>e</sup>	2.08	2.07	0.51	*	NS
Acetate : Propionate ratio	3.05	2.49	3.13 <sup>e</sup>	2.41 <sup>f</sup>	0.60	†	*

<sup>a</sup> HF = High fiber content; LF = Low fiber content.

<sup>b</sup> LS = Large particle size; SS = Small particle size.

<sup>c</sup> Standard error of the mean.

<sup>d</sup> Fiber content (F) and particle size (S) effect: NS = not significant; † *P* < 0.10; \* *P* < 0.05; \*\* *P* < 0.01.

<sup>e</sup>, <sup>f</sup> Mean with different superscripts in the same row are different.

*Nitrogen Metabolism.* The fiber content and the particle size did not affect the ammonia-N concentration or the flow of total, ammonia and non-ammonia N ( $P > 0.05$ , Table 4). Dietary and microbial N flow, protein degradation, and the efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) were estimated using the chemical composition of LAB and SAB independently.

The fiber content did not affect the flow (g/d) of microbial N, and tended ( $P < 0.10$ ) to reduce dietary N flow and increase dietary CP degradation in HF compared with LF when SAB were used in calculations. The EMPS was higher ( $P < 0.05$ ) in HF compared with LF when SAB were used for calculation. Although the numerical trends were similar between data obtained using LAB or SAB, differences were only significant when SAB data were used in calculations. Many authors (Hvelplund and Madsen, 1985; Rode *et al.*, 1985) reported that high forage diets fed *in vivo* result in higher EMPS. In contrast, results of Bourquin *et al.* (1994) indicated lower EMPS *in vivo* when 90 instead of 60% forage diet was fed. Meng *et al.* (1999) observed in continuous culture that diets with high concentration of structural carbohydrates resulted in higher EMPS compared with diets high in non-structural carbohydrates, and agree with the results obtained in the present trial.

The reduction in particle size resulted in lower dietary N flow and higher microbial N flow when LAB composition data were used in calculations ( $P < 0.05$ ), although these differences did not result in significant differences in dietary CP degradation. The EMPS was lower in LS compared with SS, although it was only significant when LAB composition data were used in calculations ( $P < 0.05$ , Table 4). Results from *in vivo* trials have shown no consistent effects of forage particle size on the EMPS. Beever *et al.* (1981) observed no effects of forage particle size on the EMPS. In contrast, Rode *et al.* (1985) found that grinding and pelleting alfalfa hay resulted in a 15% increase in EMPS in lactating dairy cows, but the higher EMPS was attributed to a faster solid dilution rate. However, in the present trial, solid dilution rate was maintained constant. The reduction in particle size also results in an increase in the surface for microbial attachment and digestion (Bowman and Firkins, 1993), and may enhance energy availability and

microbial growth. This may explain the higher EMPS observed in SS compared with LS, although differences were only significant when LAB composition was used in calculations.

Table 4. Effects of fiber content and particle size of the diets on nitrogen metabolism in continuous culture

Item	Fiber content <sup>a</sup>		Particle size <sup>b</sup>		SEM <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup> (P < )	
	HF	LF	LS	SS		F	S
NH <sub>3</sub> N, mg/100mL	17.8	18.6	18.6	17.8	3.52	NS	NS
Total N flow, g/d	3.02	3.01	3.00	3.03	0.13	NS	NS
NH <sub>3</sub> N flow, g/d	0.56	0.58	0.58	0.56	0.11	NS	NS
NAN flow, g/d	2.46	2.43	2.42	2.47	0.13	NS	NS
Dietary N flow, g/d							
LAB <sup>e</sup>	1.32	1.42	1.46 <sup>g</sup>	1.29 <sup>h</sup>	0.10	NS	*
SAB	1.17	1.41	1.35	1.23	0.30	†	NS
Bacterial N flow, g/d							
LAB	1.13	1.00	0.96 <sup>h</sup>	1.18 <sup>g</sup>	0.17	NS	*
SAB	1.29	1.02	1.08	1.24	0.26	NS	NS
Protein degradation, %							
LAB	51.9	46.9	46.7	52.1	7.17	NS	NS
SAB	57.5	47.5	50.7	54.3	10.6	†	NS
EMPS <sup>f</sup> , g/kg TOMD							
LAB	30.9	27.5	27.0 <sup>h</sup>	31.3 <sup>g</sup>	3.81	NS	*
SAB	33.3 <sup>g</sup>	26.8 <sup>h</sup>	28.8	31.3	3.75	**	NS

<sup>a</sup> HF = High fiber content; LF = Low fiber content.

<sup>b</sup> LS = Large particle size; SS = Small particle size.

<sup>c</sup> Standard error of the mean.

<sup>d</sup> Fiber (F) and particle size (S) effect: NS = not significant; †  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

<sup>e</sup> Liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria.

<sup>f</sup> Efficiency of microbial protein synthesis.

<sup>g, h</sup> Mean with different superscripts in the same row are different.

Chemical composition of LAB and SAB indicates differences in N and purine concentration, being higher in LAB compared with SAB. However, the N to purine ratio was not different between microbial populations (Table 5). The higher

mean N and marker concentration in LAB than in SAB observed in the present trial have already been reported by others (Olubobokun et al., 1988; Pérez et al., 1998). The higher marker concentration in LAB might reflect a higher protein synthesis rate and most probably a higher growth rate than in SAB (Czerkawski, 1986; Legay-Carmier and Bauchard, 1989).

Changes in the purine and N concentrations in LAB and SAB may affect the magnitude and the significance of the differences in estimates of N metabolism in fermenters. Although numerical differences between estimates of N metabolism had the same direction, the magnitude of these differences was higher in SAB compared with LAB. The standard error of most measurements in SAB was larger than in LAB, and was probably due to either incomplete or altered recovery of the microbial population through the bacteria detachment procedures. The differences observed in microbial composition between LAB and SAB suggest that many of the estimates of N metabolism changed more due to the microbial population considered than to the main factors studied. Therefore, the identification of significant effects depended on the microbial population selected for calculations. These observations indicate the importance of obtaining representative samples of the microbial population including the LAB and SAB.

#### *Effects on the Amino Acid Profile and Flow*

*Total Flow of Amino Acids in Effluents.* The fiber content and particle size did not affect the flow (g/d) of essential (EAA), non-essential (NEAA) and most of the individual AA (Table 6). Clark *et al.* (1992) indicated that, because of the large contribution of microbial protein to the total AA flow, it was difficult to modify the AA profile in the digesta unless large amounts of ruminal undegradable protein were fed. In the present study, between 39.7 and 52.4% of the protein leaving the fermenters was of microbial origin, and diets did not contain undegradable protein. The flow of Glu and Tyr was higher ( $P < 0.05$ ) in LF diets, resulting in a trend for higher NEAA flow in LF compared with HF diets ( $P < 0.10$ ). The flow of Leu tended to increase ( $P < 0.10$ ) in LF compared with HF

diets, and was attributed to the higher Leu content of corn (Rulquin and Vérité, 1993).

Table 5. Chemical composition of solid and liquid associated bacteria in continuous culture

Item	Bacteria <sup>a</sup>		SEM <sup>b</sup>	(P < ) <sup>c</sup>
	LAB	SAB		
Variable				
Bacterial N, %	9.37	8.71	0.18	**
PB content <sup>d</sup>	209.7	188.3	7.70	**
N:PB <sup>e</sup>	22.28	21.55	0.87	NS
Bacterial N flow <sup>f</sup>	1.07	1.16	0.06	NS
EMPS <sup>g</sup>	29.18	30.03	0.17	NS
Amino acid profile, %				
Aspartic acid	9.95	10.57	0.20	**
Glutamic acid	8.26	8.40	0.11	NS
Serine	5.84	5.86	0.09	NS
Threonine	6.17	6.10	0.08	NS
Glycine	10.05	10.19	0.31	NS
Alanine	11.34	11.52	0.07	*
Arginine	3.51	3.62	0.04	**
Proline	4.11	4.18	0.07	NS
Valine	5.63	5.53	0.07	NS
Methionine	1.25	1.22	0.04	NS
Isoleucine	4.81	4.65	0.10	NS
Leucine	6.26	6.17	0.06	NS
Phenylalaline	3.50	3.49	0.03	NS
Lysine	12.06	11.34	0.18	***
Histidine	2.53	2.61	0.05	†
Tyrosine	4.41	4.53	0.06	†
EAAI <sup>h</sup>	45.73	44.75	0.33	**
NEAA <sup>i</sup>	54.27	55.25	0.33	**

<sup>a</sup> Liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria.

<sup>b</sup> Standard error of the mean of differences between SAB - LAB.

<sup>c</sup> NS = not significant; † P < 0.10; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.

<sup>d</sup> Purine bases content (µM/L).

<sup>e</sup> N:PB = ratio of bacterial nitrogen to purine bases (Adenine + guanine /g DM).

<sup>f</sup> Total nitrogen flow of microbial origin, g/d. <sup>g</sup> Efficiency of microbial protein synthesis.

<sup>h</sup> Essential AA include Thr; Arg; Val; Met; Ile; Leu; Phe; Lys; His.

<sup>i</sup> Non essential AA include Ala; Asp; Glu; Gly; Pro; Ser; Tyr.



Table 6. Effect of fiber content and particle size of diets on AA flow (g/d) in continuous culture

Amino acid	Fiber content <sup>a</sup>		Particle size <sup>b</sup>		SEM <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup> ( $P < $ )	
	HF	LF	LS	SS		F	S
Aspartic acid	1.94	2.07	2.03	1.97	0.20	NS	NS
Glutamic acid	2.20 <sup>h</sup>	2.49 <sup>g</sup>	2.38	2.31	0.23	*	NS
Serine	0.87	0.92	0.90	0.88	0.08	NS	NS
Threonine	0.92	0.98	0.96	0.94	0.09	NS	NS
Glycine	0.94	0.97	0.96	0.95	0.09	NS	NS
Alanine	1.32	1.46	1.41	1.38	0.16	NS	NS
Arginine	0.92	0.99	0.92	0.99	0.16	NS	NS
Proline	0.70	0.75	0.74	0.72	0.08	NS	NS
Valine	1.04	1.13	1.09	1.08	0.11	NS	NS
Methionine	0.27	0.28	0.29	0.26	0.04	NS	NS
Isoleucine	0.89	0.96	0.93	0.93	0.10	NS	NS
Leucine	1.41	1.55	1.49	1.47	0.14	†	NS
Phenylalanine	0.84	0.88	0.88	0.84	0.09	NS	NS
Lysine	0.92	0.95	0.94	0.92	0.10	NS	NS
Histidine	0.29	0.29	0.29	0.29	0.03	NS	NS
Tyrosine	0.66 <sup>h</sup>	0.75 <sup>g</sup>	0.72	0.68	0.06	*	NS
EAA <sup>e</sup>	7.48	8.02	7.80	7.71	0.73	NS	NS
NEAA <sup>f</sup>	8.63	9.40	9.14	8.89	0.85	†	NS
Total	16.11	17.42	16.94	16.60	1.57	NS	NS

<sup>a</sup> HF = High fiber content; LF = Low fiber content.

<sup>b</sup> LS = Large particle size; SS = Small particle size.

<sup>c</sup> Standard error of the mean.

<sup>d</sup> Fiber (F) and particle size (S) effect: NS = not significant; †  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ .

<sup>e</sup> Essential AA include Thr; Arg; Val; Met; Ile; Leu; Phe; Lys; His.

<sup>f</sup> Non essential AA include Ala; Asp; Glu; Gly; Pro; Ser; Tyr.

<sup>y, z</sup> Mean with different superscripts in the same row are different

*Effects on the Amino Acid Profile of Microbial Origin.* The AA profile of LAB and SAB (Table 5) was within the ranges reported by Clark *et al.* (1992), except for Ser, Gly, Ala and Lys, that were higher, and Asp, Arg, Glu and Phe that were lower in both bacterial groups. Between population comparisons indicated that the concentration of Asp, Ala and Arg was higher ( $P < 0.05$ ), that of His and Tyr tended to be higher ( $P < 0.10$ ), and that of Lys was lower ( $P < 0.05$ ) in SAB compared with LAB. However, the numerical differences between microbial

populations were smaller, and the number of AA that differ fewer than data reported by Martin *et al.* (1996), who reported a larger difference in seven out of 11 essential or semi-essential AA depending on the time of sampling (2 vs 23 h postfeeding), and in six out of 11 AA depending on the type of diet (hay vs hay and barley).

The fiber content and particle size had a small effect on the profile of essential AA from LAB and SAB (Table 7). The interaction of fiber content by particle size was only significant for the proportion of Thr and Lys in LAB. The proportion (g AA/100g AA) was 5.97, 6.18, 6.41 and 6.11, for Thr, and 11.31, 12.07, 12.72 and 12.12 for Lys in HFLS, HFSS, LFLS, LFSS, respectively. Results of other AA are presented by main effects.

The AA profile of LAB and SAB were different in HF and LF ( $P < 0.05$ ) in five out of 16 AA studied. However, the numerical magnitude of the differences was small and dependent on the bacterial population considered (Table 7). In LAB, the profile (g AA/100 g AA) of Asp, Glu and Gly was higher and that of Ile and Lys was lower in HF compared with LF. In SAB, the proportion (g AA/100 g AA) of Ile was lower ( $P < 0.05$ ) in LF compared with HF. Overall, the proportion (g AA/100 g AA) of EAA was 2.43% lower ( $P < 0.10$ ) in HF compared with LF when LAB was used for calculations. In contrast, the concentration (g AA/100 g AA) of EAA was not affected by the content of fiber when SAB was used for calculations. However, these differences in the AA profile were smaller than those of Hussein *et al.* (1995), who reported a higher concentration of AA in a pool of ruminal bacteria (LAB and SAB) in a high forage diet (70% corn silage) compared with a low forage diet (30% corn silage).

The profile of EAA of bacteria was affected only slightly by forage particle size. The concentration of Thr and Lys were the only ones affected, and were higher ( $P < 0.05$ ) in SAB obtained from LS compared with SS.

The fiber content and particle size had a small effect on the AA profile of LAB and SAB. Lallés *et al.* (1992) and Martin *et al.* (1996) indicated that the AA composition of ruminal bacteria was a characteristic of each bacterial group and, therefore, difficult to change by dietary manipulation. Others (Ørskov, 1988;

Putnam *et al.*, 1997) reached the same conclusion when comparing the AA profile of LAB and a mixture of LAB and SAB obtained from animals fed different diets. In contrast, data summarized from literature reports (Storm and Ørskov, 1984; Clark *et al.*, 1992) and some *in vivo* trials (Hussein *et al.*, 1995) suggested that diet may affect the AA profile of ruminal bacteria. However, Clark *et al.* (1992) suggested that the differences observed in the AA profile of ruminal bacteria across different experiments may be related to differences in the methodologies used for microbial isolation, to the microbial marker used, or to the method for AA analysis.

*Effects on the Amino Acid Flow of Microbial Origin.* The flow of AA from microbial origin was calculated as:

$$\text{g AA/d} = \text{g AA/g DMbact} \times \text{g bact/d}$$

where g AA/g DM was the AA content expressed in DM basis for LAB and SAB, and g bact/d was the amount of bacterial DM synthesized daily.

The estimated flow of microbial AA was higher ( $P < 0.05$ ) for 14 out of 16 AA measured when SAB were used instead of LAB (Table 8). The average difference was of 15% in the EAA and 19% in the NEAA. Klusmeyer *et al.* (1991) also reported differences in the calculated amount of EAA from bacteria passing to the duodenum when using different bacterial population isolates (mixed, LAB or SAB), due to differences in the concentration of some AA in bacterial OM.

The proportion of Met and Lys of microbial origin flowing from the fermenters were close to the optimal level (5 and 15%, for Met and Lys, respectively) recommended for optimal milk protein productions (Rulquin and Vérité, 1993; NRC, 2001). However, the estimated proportion changed depending on the bacterial population used for calculations (4.13 and 4.69% Met and 17.4 and 16.3% Lys, when using LAB and SAB, respectively).

Table 7. Effect of fiber content and particle size of the diets on AA profile (g AA/100 g AA) of liquid and solid associated bacteria in vitro

Amino acid <sup>a</sup>		Fiber content <sup>b</sup>		Particle size <sup>c</sup>		SEM <sup>d</sup>	Effect <sup>f</sup> ( $P <$ )	
		HF	LF	LS	SS		F	S
Aspartic acid,	LAB	10.4 <sup>h</sup>	9.5 <sup>i</sup>	9.8	10.1	0.53	**	NS
	SAB	10.4	10.7	10.5	10.6	0.43	NS	NS
Glutamic acid,	LAB	8.4 <sup>h</sup>	8.1 <sup>i</sup>	8.3	8.2	0.20	**	NS
	SAB	8.3	8.5	8.6	8.2	0.33	NS	†
Serine,	LAB	5.8	5.9	5.8	5.9	0.30	NS	NS
	SAB	5.8	5.9	5.8	5.9	0.23	NS	NS
Threonine,	LAB	6.1	6.3	6.2	6.1	0.23	NS	NS
	SAB	6.1	6.1	6.0 <sup>i</sup>	6.2 <sup>h</sup>	0.15	NS	*
Glycine,	LAB	10.2 <sup>h</sup>	9.9 <sup>i</sup>	10.1	10.0	0.15	***	NS
	SAB	10.2	10.1	10.2	10.2	0.19	NS	NS
Alanine,	LAB	11.4	11.3	11.4	11.2	0.23	NS	NS
	SAB	11.5	11.5	11.7	11.4	0.26	NS	†
Arginine,	LAB	3.6	3.4	3.5	3.5	0.14	†	NS
	SAB	3.7	3.6	3.6	3.6	0.12	†	NS
Proline,	LAB	4.2	4.1	4.2	4.0	0.25	NS	NS
	SAB	4.2	4.1	4.2	4.1	0.12	†	NS
Valine,	LAB	5.6	5.6	5.6	5.7	0.36	NS	NS
	SAB	5.5	5.5	5.5	5.5	0.10	NS	NS
Methionine,	LAB	1.2	1.3	1.3	1.2	0.14	NS	NS
	SAB	1.2	1.2	1.3	1.2	0.19	NS	NS
Isoleucine,	LAB	4.7 <sup>i</sup>	4.9 <sup>h</sup>	4.9	4.7	0.21	*	NS
	SAB	4.8 <sup>h</sup>	4.5 <sup>i</sup>	4.5	4.7	0.19	*	†
Leucine,	LAB	6.2	6.3	6.4	6.2	0.18	NS	†
	SAB	6.2	6.1	6.2	6.1	0.12	NS	NS
Phenylalanine,	LAB	3.5	3.5	3.5	3.5	0.10	NS	NS
	SAB	3.5	3.5	3.5	3.5	0.08	NS	NS
Lysine,	LAB	11.7 <sup>i</sup>	12.4 <sup>h</sup>	12.0	12.1	0.60	*	NS
	SAB	11.3	11.3	11.1 <sup>h</sup>	11.5 <sup>i</sup>	0.37	NS	*
Histidine,	LAB	2.6	2.5	2.6	2.5	0.16	NS	NS
	SAB	2.7	2.5	2.6	2.6	0.22	NS	NS
Tyrosine,	LAB	4.4	4.4	4.4	4.4	0.32	NS	NS
	SAB	4.5	4.6	4.6	4.5	0.20	NS	NS
EAA <sup>f</sup> ,	LAB	45.2	46.3	45.9	45.5	0.13	†	NS
	SAB	45.0	44.5	44.4	45.1	0.76	NS	NS
NEAA <sup>g</sup> ,	LAB	54.8	53.7	54.1	54.5	1.13	†	NS
	SAB	55.0	55.5	55.6	54.9	0.76	NS	NS

<sup>a</sup> Amino acid profile (g AA/100g AA) of liquid (LAB) or solid (SAB) associated bacteria.

<sup>b</sup> HF = High fiber; LF = Low fiber content. <sup>c</sup> LS = Large particle size; SS = Small particle size.

<sup>d</sup> Standard error of the mean.

<sup>e</sup> Fiber (F) and particle size (S) effect: NS = not significant; †  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.01$ .

<sup>f</sup> Essential AA include Thr, Arg, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His.

<sup>g</sup> Non essential AA include Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Tyr.

<sup>h</sup>, <sup>i</sup> Mean with different superscripts in the same row are different

Table 8. Differences in amino acid flow (g/d) of microbial origin between solid and liquid associated bacteria in continuous culture

Amino acid flow, g/d	Bacteria <sup>a</sup>		SEM <sup>b</sup>	Effect <sup>c</sup> ( $P < $ )
	LAB	SAB		
Aspartic acid	0.62	0.77	0.05	***
Glutamic acid	0.73	0.86	0.05	*
Serine	0.32	0.37	0.02	**
Threonine	0.39	0.45	0.02	*
Glycine	0.34	0.39	0.02	*
Alanine	0.46	0.55	0.03	**
Arginine	0.33	0.40	0.02	**
Proline	0.20	0.24	0.01	*
Valine	0.46	0.52	0.03	*
Methionine	0.13	0.15	0.01	†
Isoleucine	0.42	0.47	0.02	*
Leucine	0.49	0.57	0.03	*
Phenylalanine	0.30	0.35	0.02	*
Lysine	0.54	0.59	0.04	NS
Histidine	0.10	0.12	0.01	***
Tyrosine	0.27	0.32	0.02	**
EAA <sup>d</sup>	3.15	3.62	0.19	*
NEAA <sup>e</sup>	2.94	3.50	0.19	**
Total	6.10	7.12	0.38	*

<sup>a</sup> Liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria.

<sup>b</sup> Standard error of the mean of differences between SAB-LAB.

<sup>c</sup> NS = not significant; †  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>d</sup> Essential AA include Thr; Arg; Val; Met; Ile; Leu; Phe; Lys; His.

<sup>e</sup> Non essential AA include Ala; Asp; Glu; Gly; Pro; Ser; Tyr.

The flow of each individual AA of microbial origin depends on the measurements of AA concentration and the estimated flow of microbial DM. Therefore, results are largely dependent on the representativeness of the microbial sample obtained and the accuracy of the analysis of microbial marker and AA profile. The impact of these errors on the estimation of the supply of AA of microbial origin to the small intestine is important. Because the differences in the estimated AA flow of microbial origin (g/d) resulting from the use of LAB or

SAB were larger than the actual differences in their AA profiles, the estimation of the microbial contribution to the total protein flow was more determinant to the error than the differences in the AA composition of the two microbial populations. These data reinforce the recommendations of Martin *et al.* (1996) who indicated the need to improve the accuracy of measuring the total and partial contribution of each microbial fraction to the total flow of N to the small intestine. Results indicate that the estimation of the microbial protein synthesis in the rumen and factors affecting it, and the relative contribution of each microbial population (LAB and SAB) to the total flow of microbial protein, are essential to improve the precision of the estimation of the flow of AA of microbial origin to the small intestine.

The effect of fiber content and particle size on the estimated flow of AA of microbial origin using LAB and SAB are presented in Table 9. There were no effects of particle size on bacterial AA flow. The fiber content by particle size interaction was significant for the estimated flow of Lys ( $P < 0.05$ ) when LAB was used for the calculation, being lower in HFSL (0.45 g/d) and LFSS (0.45 g/d) compared with HFSS (0.78 g/d) and LFSL (0.51 g/d).

The estimated flow (g/d) of Arg, Ile and His of bacterial origin was lower in LF compared with HF when SAB instead of LAB were used for calculations ( $P < 0.05$ ; Table 9). Total flow of AA (g/d) of microbial origin were lower ( $P < 0.05$ ) in LF compared with HF, but differences in individual AA were dependent on the microbial population used for calculations. Particle size did not affect the estimated flow of total or individual AA of microbial origin.

The flow of AA of microbial origin was calculated by multiplying bacterial flow (g/d) by the AA profile (%). Because differences in the AA profile (%) between LAB and SAB were small, and differences in the estimated flow (g/d) of AA of microbial origin between LAB and SAB large, it can be concluded that differences in the estimation of microbial protein flow had a higher impact on the estimation of the flow of AA of microbial origin than the AA profile. The accurate estimation of the flow of AA of microbial origin requires the accurate estimation of the contribution of LAB and SAB to the total N flow to the small intestine.

Table 9. Effect of fiber content and particle size of diets on the estimated flow of AA (g/d) of liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria in vitro.

Amino acid		Fiber content <sup>a</sup>		Particle size <sup>c</sup>		SEM <sup>d</sup>	Effect <sup>e</sup> ( $P <$ )	
		HF	LF	LS	SS		F	S
Aspartic acid,	LAB	0.75	0.51	0.54	0.71	0.22	†	NS
	SAB	0.93	0.62	0.69	0.86	0.34	NS	NS
Glutamic acid,	LAB	0.86	0.62	0.66	0.82	0.15	†	NS
	SAB	1.04	0.70	0.78	0.96	0.37	†	NS
Serine,	LAB	0.37	0.28	0.28	0.37	0.10	NS	NS
	SAB	0.44	0.31	0.32	0.43	0.14	†	NS
Threonine,	LAB	0.45	0.34	0.35	0.44	0.13	NS	NS
	SAB	0.54	0.36	0.39	0.51	0.18	†	NS
Glycine,	LAB	0.39	0.29	0.29	0.39	0.12	NS	NS
	SAB	0.48	0.31	0.35	0.44	0.16	†	NS
Alanine,	LAB	0.54	0.40	0.42	0.52	0.15	†	NS
	SAB	0.67	0.44	0.50	0.62	0.23	†	NS
Arginine,	LAB	0.40	0.29	0.30	0.38	0.11	†	NS
	SAB	0.50 <sup>h</sup>	0.32 <sup>i</sup>	0.35	0.46	0.16	*	NS
Proline,	LAB	0.24	0.17	0.18	0.22	0.07	†	NS
	SAB	0.29	0.19	0.21	0.27	0.09	†	NS
Valine,	LAB	0.53	0.39	0.40	0.52	0.16	NS	NS
	SAB	0.64	0.42	0.46	0.59	0.21	†	NS
Methionine,	LAB	0.15	0.12	0.12	0.14	0.04	NS	NS
	SAB	0.18	0.12	0.14	0.16	0.06	†	NS
Isoleucine,	LAB	0.47	0.37	0.37	0.47	0.13	NS	NS
	SAB	0.58 <sup>h</sup>	0.40 <sup>i</sup>	0.41	0.54	0.18	*	NS
Leucine,	LAB	0.57	0.42	0.44	0.55	0.16	NS	NS
	SAB	0.69	0.45	0.50	0.64	0.22	†	NS
Phenylalanine,	LAB	0.35	0.26	0.27	0.33	0.09	NS	NS
	SAB	0.43	0.28	0.31	0.39	0.14	†	NS
Lysine,	LAB	0.61	0.48	0.48	0.62	0.16	NS	NS
	SAB	0.73	0.48	0.52	0.69	0.23	†	NS
Histidine,	LAB	0.12	0.08	0.09	0.11	0.03	†	NS
	SAB	0.15 <sup>h</sup>	0.09 <sup>i</sup>	0.10	0.14	0.05	*	NS
Tyrosine,	LAB	0.31	0.23	0.24	0.30	0.10	NS	NS
	SAB	0.39	0.26	0.29	0.36	0.14	†	NS
EAA <sup>f</sup>	LAB	3.65	2.74	2.82	3.57	1.00	NS	NS
	SAB	4.43	2.89	3.18	4.13	1.43	†	NS
NEAA <sup>g</sup>	LAB	3.46	2.49	2.62	3.33	1.00	†	NS
	SAB	4.25	2.84	3.14	3.94	1.47	†	NS
Total	LAB	7.11	5.24	5.44	6.90	2.00	†	NS
	SAB	8.68	5.73	6.33	8.07	2.90	†	NS

<sup>a</sup> HF = High fiber; LF = Low fiber content. <sup>c</sup> LS = Large particle size; SS = Small particle size.

<sup>d</sup> Standard error of the mean.

<sup>e</sup> Fiber content (F) and particle size (S) effect; NS = not significant; †  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ .

<sup>f</sup> Essential AA include Thr, Arg, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His.

<sup>g</sup> Non essential AA include Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Tyr.

<sup>h, i</sup> Mean with different superscripts in the same row are different

## **Implications**

The fiber level and particle size had no effect on OM and fiber digestion. High fiber diets had lower total VFA, and higher acetate concentrations compared with low fiber diets. The large particle size diet had higher proportion of acetate and acetate to propionate ratio, and lower proportion of butyrate compared with the small size particle diets. These differences were independent of intake, dilution rates and pH. The effects of fiber content and particle size on microbial and dietary N flow, protein degradation, and efficiency of microbial protein synthesis were dependent on the microbial population used for calculations. The amino acid profile of microbial groups was relatively independent of diet. However, accurate estimation of microbial N flow and the partial contribution of each microbial population may affect the estimated flow of amino acids of microbial origin.

## **Literature Cited**

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Balcells, J. J., J. M. Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575:153-157.
- Beever, D. E., D. F. Osbourn, S. B. Cammel, and R. A. Terry. 1981. The effect of grinding and pelleting on the digestion of Italian ryegrass and timothy by sheep. *Br. J. Nutr.* 46:357-370.
- Bourquin, L. D., E. C. Titgemeyer, J. Van Milgen, and G. C. Fahey. 1994. Forage level and particle size effects on orchardgrass digestion by steers: II. Ruminal digestion kinetics of cell wall components. *J. Anim. Sci.* 72:759-767.



- Bowman, J. G., and J. L. Firkins. 1993. Effects of forage species and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization in situ. *J. Anim. Sci.* 71:1623-1633.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Clark, J. H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 75:2304-2323.
- Czerkawski, J. W. 1986. Degradation of solid feed in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its consequences. Pages 158-172 in *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. L. P. Milligan, W. L. Grovum, and A. Dobson (eds). Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Fahey, G. C. Jr., L. D. Bourquin, E. C. Titgemeyer, and D. G. Atwell. 1993. Postharvest treatment of fibrous feedstuffs to improve their nutritive value. Pages 715-766 in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (eds). ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Grant, R. J., V. F. Colenbrander, and D. R. Mertens. 1990. Milk fat depression in dairy cows: Role of particle size of alfalfa hay. *J. Dairy Sci.* 73:1823-1833.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755-2766.
- Hoover, W. H., P. H. Knowlton, M. D. Stern, and C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous culture of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:535-542.
- Hussein, H. S., N. R. Merchen, and G. C. Fahey Jr. 1995. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary forage level and fat supplementation. *J. Anim. Sci.* 73:2469-2473.

- Hvelplund, T., and J. Madsen. 1985. Amino acid passage to the small intestine in dairy cows compared with estimates of microbial protein and undegraded dietary protein from analysis on the feed. *Acta Agric. Scand. (Suppl)*. 25:20-35.
- Jarrige R., E. Grenet, C. Demarquilly, and J. M. Besle. 1995. Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. Pages 25-81 in *Nutrition des Ruminants Domestiques*. R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M. H. Farce, and M. Journet (eds). Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobics fermentor content. *Sci. Aliments* 2:131-144.
- Klusmeyer, T. H., M. W. Ohl, and J. H. Clark. 1991. Effect of using particle-associated (PAB), fluid associated (FAB) or mixed rumen bacteria (MB) for calculating nutrient flow to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74(Suppl.1):248(Abstr).
- Lallès, J. P., C. Poncet, and R. Toullec. 1992. Composition en acides amines des bactéries libres et des bactéries fixées aux particules alimentaires du rétículo-rumen du veau sevré et du mouton recevant différentes rations. *Ann. Zootech.* 41:75-76.
- Legay-Carmier, F., and D. Bauchart. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. *Br. J. Nutr.* 61:725-740.
- Martín, C., A. G. Williams, and B. Michalet-Doreau. 1994. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal content. *J. Anim Sci.* 72:2962-2968.
- Martin, C., L. Bernard, and B. Michalet-Doreau. 1996. Influence of sampling time and diet on amino acid composition of protozoa and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *J. Anim. Sci.* 74:1157-1163.

- Meng, Q., M. S. Kerley, P. A. Ludden, and R. L. Belyea. 1999. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 77:206-214.
- Minato, H., and T. Suto. 1978. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder *in vitro* and elution of bacteria attached therefrom. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24:1-16.
- National Research Council. 2001. Pages 43-104 in *Nutrient Requirement of Dairy Cattle*. 7th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Nocek, J. E., and R. A. Kohn. 1988. *In situ* particle size reduction of alfalfa and timothy hay as influenced by form and particle size. *J. Dairy Sci.* 71:932-945.
- O'Connor, J. D., C. J. Sniffen, D. G. Fox., and W. Chalupa. 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV Predicting amino acid adequacy. *J. Dairy Sci.* 71:1298-1311.
- Olubobokun, J. A., and W. M. Craig. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 68:3360-3370.
- Olubobokun, J. A., W. M. Craig, and W. A. Nipper. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 66:2701-2710.
- Ørskov, E. R. 1988. *Nutrición proteica de los rumiantes*. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España.
- Pérez, J. F., J. Balcells, M. Fondevila, and J. A. Guada. 1998. Composition of liquid- and particle-associated bacteria and their contribution to the rumen outflow. *Aust. J. Agric. Res.* 49:907-914.

- Putnam, D. E., C. G. Schwab, M. T. Socha, N. L. Whitehouse, N. A. Kierstead, and B. D. Garthwaite. 1997. Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fractions and amino acids to the small intestine. *J. Dairy Sci.* 80:374-384.
- Rode, L. M., D. C. Weakley, and L. D. Satter. 1985. Effect of forage amount and particle size in diets of lactating dairy cows on site of digestion and microbial protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.* 65:101-111.
- Rulquin, H., and R. Vérité. 1993. Amino acid nutrition of dairy cows: productive effects and animal requirements. Pages 55-77 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy and D. J. A. Cole (eds). Nottingham University Press, UK.
- Russell, J. B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 81:3222-3230.
- Shaver, R. D., A. J. Nytes, L. D. Satter, and N. A. Jorgesen. 1986. Influence of amount of feed intake and forage physical form on digestion and passage of prebloom alfalfa hay in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69:1545-1559.
- Siciliano-Jones, J., and M. R. Murphy. 1989. Production of volatile fatty acids in the rumen and caecum-colom of steers as affected by forage:concentrate and forage physical form. *J. Dairy Sci.* 72:485-492.
- Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1988. *Bioestadística: principios y prodecimientos*. 2ª Edición. McGraw-Hill. Inc. USA.
- Storm, E., and E. R. Ørskov. 1984. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminant. 4. The limiting amino acids of microbial protein in growing sheep determined by a new approach. *Br. J. Nutr.* 52:613-620.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3588-3597.

Vendrell, J., and F. X. Avilés. 1986. Complete amino acid analysis of protein by dabsyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 358:401-413.

Weller, R. A., and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32:341-351.

Whitehouse, N. L., V. M. Olson, C. G. Schwab, W. R. Chesbro, K. D. Cunningham, and K. D. Lycos. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72:1335-1343.

## CAPÍTULO 4

Efecto del pH y la tasa de dilución sobre el perfil y flujo de aminoácidos de origen microbiano en un sistema de cultivo continuo

**The role of pH and dilution rate on the profile and flow of amino acids of microbial origin in a continuous culture system**

## The role of pH and dilution rate on the profile and flow of amino acids of microbial origin in a continuous culture system

**ABSTRACT:** Eight dual-flow continuous culture fermenters (1,320 mL) were used in two consecutive 10-d periods to study the effects of pH and solid dilution rates on microbial fermentation and nutrient flows using liquid (LAB) or solid (SAB) associated bacteria. Treatments were arranged in a 2 x 2 factorial, being pH (High = 6.5; Low = 5.5) and solid dilution rate (Slow: 4%/h = SDR; or Fast: 10%/h = FSDR) the main factors. The liquid dilution rate was 10%/h for all treatments. Fermenters were fed continuously 80 g DM/d of a 60 to 40 forage to concentrate ratio diet (17% CP, 29.3% NDF). Each period consisted of 7 d for adaptation and 3 d for sampling. The last day of the experiment LAB and SAB were isolated from each fermenter for chemical analysis. True digestibility of DM and OM were lower at low pH only when SAB were used for calculations. Fiber digestion was also lower at low pH and FSDR. The VFA production and profile were affected more by pH than DR. At pH 5.5, the ammonia N concentration and flow ( $P < 0.05$ ), and protein degradation ( $P < 0.10$ ) were lower, and that of dietary N flow higher ( $P < 0.10$ ) compared with pH 6.5. The efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) tended ( $P < 0.10$ ) to be higher at low pH, only when SAB were used for calculations. The FSDR was characterized by a higher bacterial N flow, protein degradation and EMPS, and a lower dietary N flow compared with SDR. However, results of dietary N flow and protein degradation were different depending on the bacterial population selected for calculations. To estimate the contribution of microbial AA to the total AA flow using LAB or SAB, the AA content of each bacterial isolate was multiplied by the bacterial DM flow

estimated within each isolate. Solid dilution rate and pH affected ( $P < 0.05$ ) the AA profile of LAB and SAB. The pH did not affect the estimated flow of bacterial AA. The change of solid dilution rate (10 to 4%/h) resulted in differences in the estimated flow of microbial AA in 11 out of the 16 AA measured. The number of AA that changed were dependent of the microbial population data used. When the average across all treatments of the AA content (gAA/100 gAA) or flow (g/d) of SAB vs LAB were compared, no significant differences were detected, except for the content of Phe, His, and Tyr. Results demonstrate that dilution rate and pH affected microbial fermentation profile. However, results were different depending on the microbial population selected for calculations. The AA content of SAB and LAB may be different and affected by ruminal fermentation conditions. However, variation in the estimation of microbial protein synthesis observed with changes in solid dilution rate has a greater impact than differences in the AA profile in the estimated microbial AA flow.

**Key words:** Ruminal pH, Dilution Rate, Bacteria, Amino Acids

## **Introduction**

The supply of large amounts of energy to high producing dairy cows is achieved by high intake of highly concentrated diets. In this conditions, rumen passage rates increase and ruminal pH decreases (Faichney, 1993; Sauvant *et al.*, 1999). These changes may affect ruminal fermentation (Mould *et al.*, 1984; Shriver *et al.*, 1986; Hoover, 1986) and the flow of total and microbial N to the small intestine (SI, Crawford *et al.*, 1980b). The study of the effects of pH or dilution rates on microbial fermentation and nutrient flow *in vivo* are often confounded with changes in intake and type of diets. The *in vitro* rumen fermentation simulation systems may provide a valuable tool to study these effects while maintaining intake and type of diet.

Current feeding systems for dairy cattle include the prediction of AA requirements and supply to the SI (INRA, 1988; O'Connor *et al.*, 1993; NRC,



2001). Between 50 to 80% of the AA flowing to the SI are from microbial origin (Storm and Ørskov, 1983). Although the largest proportion (80%) of the rumen microbial population is attached to feed particles (Craig *et al.*, 1987; Olubobokun *et al.*, 1988), most research has been conducted using the microbial population associated with the liquid fraction (LAB). There is considerable evidence that the chemical composition (Legay-Carmier and Bauchart, 1989; Martin *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1998) and the AA profile (Lallès *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2001) of solid (SAB) and LAB differ. These differences may be responsible for error in the prediction of the flow of bacterial protein and AA. Therefore, it appears necessary to identify the magnitude of these differences and its impact on the prediction of the profile and flow of AA of microbial origin to the SI. It is likely that fermentation conditions as pH and dilution rate, may affect the partial contribution of LAB and SAB, and therefore, their estimated contribution to the supply of nutrients to the SI.

The objective of this experiment was to evaluate the effect of pH and solids dilution rate on microbial fermentation and the estimation of the AA flow from microbial origin in continuous culture, using the composition of SAB and LAB. The hypothesis is that if the AA profile of SAB and LAB are different (Martin *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001), a reduction in solid dilution rate and pH will reduce the SAB population and, therefore modifying the AA profile and microbial protein flowing out of the fermenters.

## **Materials and Methods**

### *Continuous Culture System, Diet and Treatments*

Eight 1,320-mL dual flow continuous culture fermenters (Hoover *et al.*, 1976) were used in two consecutive 10-d periods. Fermenters were inoculated with rumen fluid strained through four layers of cheesecloth taken from a ruminally cannulated cow fed a 50 to 50 forage to concentrate diet. The experimental diet was formulated to meet or exceed NRC (2001) requirement for lactating dairy cows producing 35 kg of milk, and consisted of (DM basis): 59.2%

alfalfa hay, 24.6% ground corn grain, 6.46% soybean meal, 3.67% corn gluten feed, 4.6% molasses, 1.46% minerals and vitamins, and contained 17% CP, 29.3% NDF, 20.4% ADF, and 42.8% nonstructural carbohydrate (NSC). A total of 80 g DM/d were fed continuously. Temperature was maintained at 39°C and pH was controlled by infusion of 3N HCl or 5N NaOH. Anaerobic conditions were maintained by infusion of N<sub>2</sub> at a rate of 40 mL/min. Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into flask and contained 0.187 g/d of non nitrogen protein to simulate recycled N.

Treatments were arranged as a 2 x 2 factorial, being the pH (High = H, 6.5; Low = L, 5.5) and solid dilution rate (Slow: 4%/h = SSSDR; or Fast: 10%/h = FSSDR) the main factors. Liquid dilution rate was 10%/h for all treatments. Treatments were the combinations of pH and solid dilution rates: L-SSDR, H-SSDR, L-FSSDR, and H-FSSDR, respectively. Treatments were randomly assigned within period to fermenter units.

#### *Sample Collection and Bacterial Detachment Procedure*

Each experimental period consisted of 7 d for adaptation and 3 d for sampling. During sampling days, collection vessels were maintained at 4°C to prevent microbial growth. Solid and liquid effluent content were mixed and homogenized for 1 min, and a 500 mL sample was removed via aspiration. Upon completion of each period, effluents from the three sampling days were composited and mixed within fermenter. Three subsamples of mixed effluent were taken, two of them were acidified with either HCl (4 mL effluent in 4 mL 0.2N HCl) or H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (4 mL effluent in 1 mL of 0.2% ClHg, 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.2% 4-methyl valerate) and frozen until analyzed for ammonia N (NH<sub>3</sub> N) and volatile fatty acid (VFA) concentrations, respectively. A third subsample was taken in triplicate for total N analysis. Two 250-mL portions of each composited sample were freeze-dried, ground through a 1-mm screen and used for DM, ash, NDF, ADF, purine bases and AA analysis.

Solid (SAB) and liquid (LAB) associated bacteria were obtained the last day of each experimental period. The LAB were obtained by filtration of fermenter flask contents through two layers of cheesecloth. The solid fraction was washed with saline solution (0.85% wt/vol NaCl, in a 3 to 1 saline solution to solid fraction proportion) to remove residual bacteria of the liquid fraction (Olubobokun and Craig, 1990), and the filtrate was added to the LAB preparation. The filtrate was centrifuged for 10 min at 1,000 x g to remove feed residues. The supernatant fraction was centrifuged twice for 20 min at 20,000 x g to isolate LAB, and washed twice (once with saline solution and a second time with distilled water to reduce mineral contamination of the sample). The final bacterial pellet was freeze-dried for subsequent analysis.

The SAB were obtained by using a combination of several detachment procedures (Whitehouse *et al.*, 1994) selected to obtain the maximum detachment without affecting cell integrity. The fermenter solid residue combined with the feed residue pellet obtained in the first centrifugation of the LAB separation procedure was suspended in a saline solution with 0.1% methylcellulose (proportion 3 to 1 saline solution to solid-fraction ratio), and incubated in a shaking water bath at 37°C for 30 min to remove attached bacteria (Minato and Suto, 1978). After the incubation, samples were refrigerated for 24 h at 4 °C, and solid residues were agitated for one hour with marbles (30 2-mm and 15 4-mm diameter marbles) to dislodge loosely attached bacteria. Finally, the solid fraction was filtered through cheesecloth and washed three times with saline solution. The SAB were obtained by differential centrifugation as in the LAB isolation procedure. The use of chemical (alcohol, formaldehyde, acids) or physical (homogenization) treatments (Whitehouse *et al.*, 1994) were avoided to prevent changes in microbial cell integrity or modification in their AA composition.

### *Sample Analyses*

The DM and ash content in feed, bacteria and effluents, and ether extract in diets were determined according to AOAC (1990). The NDF and ADF

concentrations in feed and effluents were determined sequentially (Van Soest *et al.*, 1991). Total N in feed, effluents and bacterial samples were determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1990). The NH<sub>3</sub> N was determined by a colorimetric procedure (Chaney and Marbach, 1962). The VFA concentrations in deproteinised effluent fluid samples were determined by gas chromatography (GLC Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using 4-methylvaleric as internal standard (Jouany, 1982). Purine bases (adenine and guanine) in bacteria and effluent samples were determined by HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using allopurinol as internal standard (Balcells *et al.*, 1992). Bacteria (1 mg) and effluent samples (5 mg) for AA analysis were hydrolyzed with 200 µL of 6 N HCl at 110°C for 24 h in sealed, evacuated tubes. Stability of methionine residues was achieved by adding mercaptoethanol as a reducing agent. Derivatization was conducted with 200 nmol per tube of dabsyl chloride at 70°C for 12 min. Amino acid analysis was performed by reverse-phase HPLC (Beckmann instruments, Palo Alto, CA) using norleucine as internal standard (Vendrell and Avilés, 1986).

### *Statistical Analyses*

Data was analyzed as a completely randomized block design with a factorial arrangement of treatment (Steel and Torrie, 1988) with the following model:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + pH_j + DR_k + (pH \times DR)_{jk} + \varepsilon_{ijkl},$$

where  $\mu$  was the mean, B was the period as block, pH was the pH effect, DR was the dilution rate effect, and pH x DR their interaction. Statistical analysis was conducted using SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC., 1988). Microbial fermentation profile and nutrient flow data were analyzed using the PROC GLM. Least square mean difference test was used to compare treatments means, and differences in the AA profile and flow between SAB and LAB were analyzed as a paired t-test comparison (Steel and Torrie, 1988) using the MEANS procedure.

## Results and Discussion

Because there were no interactions between pH and dilution rate ( $P > 0.10$ ), main effect are reported unless otherwise indicated.

### *Digestibility Coefficients*

True DM (TDMD) and OM (TOMD) digestion were higher at pH 6.5 compared with pH 5.5, but differences were only significant when SAB data ( $P < 0.05$ ) were used for calculations (Table 1). The lack of significance when LAB were used for calculations was attributed to the larger standard error. There was essentially no fiber digestion at pH 5.5 compared with pH 6.5 ( $P < 0.01$ ). True DM, OM and fiber digestibility were lower than reported in other *in vitro* studies when changes in pH were evaluated (Hoover *et al.*, 1982; Shriver *et al.*, 1986; Calsamiglia *et al.*, 2002). However, the reduction in DM, OM and fiber digestion at low pH compared with high pH agrees with previous *in vitro* (Erfle *et al.*, 1982, Hoover *et al.*, 1984, Shriver *et al.*, 1986) and *in vivo* (Mould *et al.*, 1984) reports. This reduction has been attributed to an inhibition of cellulolysis when ruminal pH drops below 6.0 (Erfle *et al.*, 1982; Mould *et al.*, 1984), probably due to a reduction in bacterial attachment to feed particles or to a reduction in activity or numbers of cellulolytic bacteria (Shriver *et al.*, 1986; Russell and Dombroski, 1980; Russell and Wilson, 1996).

There was no effect of solid dilution rate on TDMD and TOMD digestion. Fiber digestion was lower ( $P < 0.01$ ) in FSDR compared with SSDR (Table 1). The increase in the solid dilution rate was expected to decrease DM and fiber digestibility. Hoover *et al.* (1982), using a dual flow continuous culture system, reported a decrease in DM (68.2 to 43.3%), and ADF (50.3 to 13.3%) digestibility when solid dilution rate increased from 2.5 to 6.25%/h. Similarly, Schadt *et al.* (1999), using a similar device, also reported a decrease of digestion coefficients for DM, NDF, and ADF when solid dilution rate increasing from 3.3 to 10%/h, using diets that contained soybean meal or alfalfa hay. Although results of the present trial have the same numerical trends, differences were not always

significant ( $P > 0.10$ ). The lower DM and fiber digestion in FSDR is attributed to a lower exposure time of feed particles for microbial enzymatic attack at faster solid dilution rates (Hoover *et al.*, 1982, Schadt *et al.*, 1999).

Table 1. Effect of pH and dilution rate on apparent and true DM, OM, NDF and ADF digestion in continuous culture

Item	pH <sup>a</sup>		DR <sup>b</sup>		SEM <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup> (P < )	
	5.5	6.5	FSDR	SSDR		pH	DR
<b>Apparent digestibility</b>							
DM, %	40.2	44.9	39.1	46.0	1.12	*	**
OM, %	27.9	32.8	26.8	33.9	1.16	*	**
<b>True digestibility<sup>e</sup></b>							
DM <sub>LAB</sub> , %	57.5	62.2	58.6	61.2	2.01	NS	NS
DM <sub>SAB</sub> , %	57.7	63.7	59.7	61.7	1.34	*	NS
OM <sub>LAB</sub> , %	45.2	49.0	45.5	48.7	1.88	NS	NS
OM <sub>SAB</sub> , %	44.4	50.7	46.3	48.8	1.40	*	NS
<b>Fiber digestibility</b>							
NDF, %	2.5	16.5	2.6	16.3	2.16	**	**
ADF, %	-5.5	17.6	-2.8	14.9	2.93	***	**

<sup>a</sup> pH = High = 6.5; Low = 5.5.

<sup>b</sup> DR = dilution rate: FSDR = fast solid dilution rate and SSDR = slow solid dilution rate.

<sup>c</sup> Standard error of the mean.

<sup>d</sup> pH and dilution rate effect: NS = not significant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>e</sup> Using liquid (LAB) or solid (SAB) associated bacteria.

### Effects on Ruminal Fermentation

**Volatile Fatty Acids Production and Profile.** The reduction of pH from 6.5 to 5.5 resulted in a reduction ( $P < 0.05$ ) in the total production of VFA, the acetate and the branched-chain VFA proportions, and in the acetate to propionate ratio, and in an increase in the proportion of propionate (Table 2). The results are similar to those obtained in *in vivo* (Lana *et al.*, 1998, Sauvant *et al.*, 1999) and *in vitro* (Crawford *et al.*, 1980a, Shriver *et al.*, 1986; Calsamiglia *et al.*, 2002) at

different pH, and are likely due to a reduction in the cellulolytic activity of rumen bacteria (Mould *et al.*, 1984; Shriver *et al.*, 1986; Calsamiglia *et al.*, 2002). De Veth and Kolver (2001) conducted a similar experiment in a continuous culture system and reported a reduction in total VFA concentration (62.5 vs 40.3 mM), and in the acetate (38.4 vs 23.9 mM), and propionate (14.6 vs 9.7 mM) proportions as pH decline from 6.6 to 5.4, but the acetate to propionate ratio was not affected by changes in pH (2.6 vs 2.8).

The dilution rate affected only the total VFA production, which tended ( $P < 0.10$ ) to be higher in a SDR compared FSDR, and the acetate to propionate ratio, which was higher at SDR compared with FSDR ( $P < 0.05$ ). In general, the VFA production and profile were affected more by pH than by solid dilution rate (Table 2). These results agree with those of Hoover *et al.* (1982), who reported no changes on VFA production and profile when solid dilution rate increased from 2.5 to 6.25%, and with that of Shriver *et al.* (1986), who observed no changes on VFA production or concentration of acetate, propionate and butyrate as a result of increasing both liquid (from 4 to 16%/h) and solid (from 3.3 to 5.5%/h) dilution rates. Results of this experiment supports conclusions of Hoover *et al.* (1982), who indicated that changes in solid dilution rates alone may not have a major effect on VFA proportions. The increase in the acetate to propionate ratio suggest that a slower dilution rate there was more fiber digestion, and therefore, a higher acetate production.

**Nitrogen Metabolism.** Dietary and microbial N flow, protein degradation, and the efficiency of microbial protein synthesis (EMPS) were estimated using the chemical composition of LAB and SAB independently (Table 3). Ammonia N concentration (mg/dL) and ammonia N flow (g/d) decreased ( $P < 0.05$ ) at pH 5.5 compared to 6.5, and resulted in an increase in the non-ammonia N flow ( $P < 0.05$ ). Dietary N flow tended to be higher ( $P < 0.10$ ) at pH 5.5 compared with pH 6.5, and was consistent with the lower protein degradation at pH 5.5 ( $P < 0.10$ ). The effect of pH on dietary N flow and protein degradation were independent of type of the bacterial group used for calculations. The EMPS was not affected by pH, although there was a trend for being higher ( $P < 0.10$ ) at pH 5.5 when SAB were used for calculations.

However, this trend was the results of a reduced OM digestion (Table 1) rather than an increase in the flow of microbial N (Table 3).

The lower ammonia N concentration and protein degradation observed at pH 5.5 has been frequently reported by other authors (Hoover *et al.*, 1984; Shriver *et al.*, 1986; Calsamiglia *et al.*, 2002). However, in all treatments, the ammonia N concentration was above the 5 mg/dL (Satter and Slyter, 1974) or 10 mg/dL (Van Soest, 1994) suggested to be necessary to maintain microbial growth, suggesting that N availability did not limit microbial activity.

Table 2. Effect of pH and dilution rate on volatile fatty acid production and profile by mixed ruminal bacteria in continuous culture

Item	pH <sup>a</sup>		DR <sup>b</sup>		SEM <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup> (P < )	
	5.5	6.5	FSDR	SSDR		pH	DR
Total VFA, mM	61.4	73.2	64.1	70.4	2.24	**	†
Individual VFA, %							
Acetate	58.2	64.9	61.3	61.8	0.82	***	NS
Propionate	25.4	16.8	21.6	20.6	0.90	***	NS
Butyrate	10.6	11.3	11.2	10.8	0.31	NS	NS
Iso-Butyrate	1.1	1.3	1.2	1.2	0.03	**	NS
Valerate	3.5	3.3	3.4	3.4	0.17	NS	NS
Iso-Valerate	1.2	2.4	1.4	2.2	0.35	*	NS
Branched-chain VFA	2.3	3.6	2.6	3.4	0.37	*	NS
Acetate: propionate ratio	2.3	3.9	3.0	3.2	0.11	***	*

<sup>a</sup> pH = High = 6.5; Low = 5.5.

<sup>b</sup> DR = dilution rate: FSDR = fast solid dilution rate and SSDR = slow solid dilution rate.

<sup>c</sup> Standard error of the mean.

<sup>d</sup> pH and dilution rate effect: NS = not significant; † P < 0.10; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.

The lower protein degradation observed at low pH conditions may be related to the reduction in fiber digestibility (Table 1). The fiber associated with



the protein, may restrict the access of proteolytic bacteria to the protein in feed, because undigested fiber would limit protease activity (Hoover, 1986; Ørskov, 1988). This hypothesis has been also suggested by Wallace and Cotta (1989), and supported by recent experimental reports (Devant *et al.*, 2000; Calsamiglia *et al.*, 2002).

Table 3. Effect of pH and dilution rate on nitrogen metabolism of ruminal bacteria population in continuous culture

Item	pH <sup>a</sup>		DR <sup>b</sup>		SEM <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup> ( $P < $ )	
	5.5	6.5	FSDR	SSDR		pH	DR
NH <sub>3</sub> N, mg/100mL	10.7	17.6	14.2	14.1	1.29	**	NS
Total N flow, g/d	2.65	2.64	2.66	2.63	0.02	NS	NS
NH <sub>3</sub> N Flow, g/d	0.35	0.56	0.44	0.46	0.05	*	NS
NA N flow, g/d	2.29	2.09	2.22	2.16	0.05	*	NS
Dietary N flow, g/d							
LAB <sup>e</sup>	1.02	0.73	0.76	1.00	0.11	†	NS
SAB	1.01	0.75	0.73	1.03	0.09	†	*
Bacterial N flow, g/d							
LAB	1.28	1.32	1.46	1.14	0.09	NS	*
SAB	1.30	1.32	1.49	1.12	0.06	NS	**
Protein degradation, %							
LAB	52.0	65.5	64.3	53.1	5.00	†	NS
SAB	52.5	64.8	65.9	51.4	4.14	†	*
EMPS <sup>f</sup> , g/kg TOMD							
LAB	35.0	32.6	38.9	28.7	2.04	NS	**
SAB	35.7	32.5	40.2	28.0	1.22	†	***

<sup>a</sup> pH = High= 6.5; Low = 5.5.

<sup>b</sup> DR = dilution rate: FSDR = fast solid dilution rate and SSDR = slow solid dilution rate.

<sup>c</sup> Standard error of the mean.

<sup>d</sup> pH and dilution rate effect: NS = not significant; †  $P < 0.10$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>e</sup> Using liquid (LAB) or solid (SAB) associated bacteria.

<sup>f</sup> Efficiency of microbial protein synthesis.

The lack of effect of pH on bacterial N flow may be explained by the combination of a reduced OM digestion (Table 1), and increased EMPS (Table 3) at pH 5.5 compared to pH 6.5. This lack of effect of pH on bacterial N flow agrees with results of Calsamiglia *et al.* (2002), who using a similar system and diet (60 to 40 forage to concentrate) did not observe differences in bacterial N flow when the pH was reduced from 6.4 to 5.7. In contrast, De Veth and Kolver (2001) reported that the quantity of microbial N flowing from the continuous culture system (g/d) increased quadratically from 0.54 g of N/d at pH 5.4 to 0.66 g of N/d at pH 6.6, with microbial N flow being greatest at pH 5.8 (0.71 g/d) and 6.2 (0.69 g/d). In this case, the increase in microbial N flow was explained as a function of increased OM digestion and increased EMPS when a high quality pasture (ryegrass dominant) was fed to fermenters.

The small effect of pH on EMPS agrees with conclusions of Hoover and Miller (1992), who based on *in vitro* results indicated that the EMPS was only depressed when pH decreased below 5.5. Some data obtained from studies where pH values within the range evaluated in this experiment also indicated that the EMPS was higher at low pH (Shriver *et al.*, 1986; De Veth and Kolver, 2001), although in most cases the numerical differences were not significant (Calsamiglia *et al.*, 2002).

There were no effects of dilution rate on ammonia N concentration or total, ammonia and non-ammonia N flows (Table 3). Dietary N flow (g/d) decreased by 29% in FSDR compared with SSDR, when SAB data were used for calculations ( $P < 0.05$ ). However, while differences were numerically important (a reduction of 24%), there was no difference in dietary N flow when LAB data were used. The higher error observed with LAB was probably responsible of lack of statistical significance. The reduction in dietary N flow corresponded with a higher microbial N flow ( $P < 0.05$ ) when using LAB (increase of 28%) or SAB (increase of 33%). The lower dietary N flow in the FSDR was consistent with a higher protein degradation, although differences were only significant when SAB were used for calculations ( $P < 0.05$ ). The bacterial N flow (g/d) and EMPS (g/kg TOMD) were

higher at FSDR compared to SSDR, independently of the bacterial population used for calculations.

As the solid dilution rate is increased, it is expected an increase in dietary N flow and a decrease in protein degradation (Ørskov, 1988; Schadt *et al.*, 1999). However, our results indicate the opposite effect, and there is no obvious explanation to justify it. The higher bacterial N flow in FSDR compared to SSDR was mainly attributed to a higher EMPS. Schadt *et al.* (1999) using a dual continuous culture system also reported an increase in microbial protein synthesis with increasing solid dilution rate when alfalfa hay and soybean meal based diets were used, but the response was the result of the combination of higher solid dilution rate and higher intake. Results obtained using a single (Isaacson *et al.*, 1975; Meng *et al.*, 1999) or dual continuous culture system (Crawford *et al.*, 1980b; Hoover *et al.*, 1982) indicate that the EMPS is positively correlated with the increase in the dilution rate.

Purine and N concentration were higher in LAB compared with SAB. However, the purine to N ratio, the estimated flow of bacterial N and the EMPS were not different between microbial populations (Table 4). The higher mean N content and marker concentration in LAB than in SAB observed in this study are consistent with previous reports (Martin *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001). Differences in N and marker concentration between LAB and SAB may reflect differences in the stage of growth and nutrition of particular bacterial populations as well as varying bacterial species within different populations (Czerkawski, 1976; Legay-Carmier and Bauchart, 1989).

Due to the differences in microbial composition, many of the estimates of N metabolism changed more due to the microbial population considered than to the main factors studied. Therefore, the identification of significant effects is dependent on the microbial population selected for calculations. These observations agree with those of Cecava *et al.* (1990) and Martin *et al.* (1996), who suggests that the study of rumen microbial fermentation requires to obtain a true representative sample of the rumen microbial population. Mechanistic models need to incorporate the differences in the growth characteristics of

different microbial populations, and their differences in chemical composition. However, many current feeding systems ignore these differences (INRA, 1988; O'Connor *et al.*, 1993; NRC, 2001), and are not included in the model. Evidence from this trial and others (Martin *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001) demonstrate that there is enough data available to incorporate the differences in the chemical composition of bacteria into mechanistic models that already differentiate between microbial populations (O'Connor *et al.*, 1993).

#### *Effects on the Amino Acid Profile and Flow*

*Total Flow of Amino Acids in Effluents.* Neither pH nor the solid dilution rate affected the flow of total, essential, non-essential or individual AA (Table 5). This occurred in spite of the differences in the non-ammonia, dietary and bacterial N flows (Table 3). Only the flow of Met was 17% lower at pH 5.5 compared with pH 6.5 ( $P < 0.05$ ). This difference was biologically relevant, because Met is a limiting AA for milk production (NRC, 2001). However, there is no obvious explanation to justify this change. Calsamiglia *et al.* (2002), using a similar continuous culture system, reported differences in effluent flow of Arg, Gly, Leu, Lys and His, but not in Met, when a similar diet was fermented at pH 6.4 compared with pH 5.7.

#### *Bacterial Amino Acid Profile.*

The amino acid profile (gAA/100 gAA) of LAB and SAB (Table 4) were within the range reported by Clark *et al.* (1992), except for Gly, Ala, Ser and Lys, that were higher, and Glu, Arg, Ile and Phe that were lower in both bacterial groups. Between population comparisons indicated that the concentration of Phe and His was higher ( $P < 0.05$ ), that of Tyr was lower ( $P < 0.05$ ), and that of Thr tended to be lower ( $P < 0.10$ ) in SAB compared with LAB. However, the numerical magnitude was lower, and the number of AA were fewer than data reported by other *in vivo* studies. Martin *et al.* (1996) reported differences in 10 AA out of 17 studied between LAB and SAB.

Table 4. Differences between solid and liquid associated bacteria in continuous culture.

Item	Bacteria <sup>a</sup>		SEM <sup>b</sup>	Effect <sup>c</sup> (P < )
	LAB	SAB		
Variable				
Bacterial N, %	9.55	8.84	0.10	**
PB content <sup>d</sup>	207	193	5.37	*
N:PB <sup>e</sup>	21.7	21.9	0.50	NS
Bacterial N flow <sup>f</sup>	1.30	1.31	0.03	NS
EMPS <sup>g</sup>	33.8	34.1	0.96	NS
Amino acid (gAA/100 gAA)				
Aspartic acid	11.26	11.10	0.29	NS
Glutamic acid	8.86	8.87	0.09	NS
Serine	5.64	5.64	0.03	NS
Threonine	5.99	5.90	0.04	†
Glycine	10.05	10.04	0.05	NS
Alanine	12.25	12.31	0.10	NS
Arginine	3.48	3.51	0.02	NS
Proline	4.22	4.29	0.07	NS
Valine	5.06	5.07	0.12	NS
Methionine	1.30	1.26	0.06	NS
Isoleucine	4.08	4.02	0.11	NS
Leucine	5.87	6.01	0.11	NS
Phenylalaline	3.32	3.43	0.04	*
Lysine	11.24	10.94	0.21	NS
Histidine	2.87	2.97	0.04	*
Tyrosine	4.67	4.61	0.08	*
Essential <sup>h</sup>	43.04	43.14	0.49	NS
Nonessential <sup>i</sup>	56.96	56.86	0.49	NS

<sup>a</sup> Mean value for solid (SAB) and liquid (LAB) associated bacteria.

<sup>b</sup> Standard error of the mean of differences SAB-LAB.

<sup>c</sup> NS = not significant; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01.

<sup>d</sup> Purine bases content (μM/L).

<sup>e</sup> N:PB = % bacterial nitrogen to purine bases (Adenine + guanine ) content, ratio.

<sup>f</sup> Total nitrogen flow of microbial origin, g/d. <sup>g</sup> Efficiency of microbial protein synthesis.

<sup>h</sup> Include Thr; Arg; Val; Met; Ile; Leu; Phe; Lys; His.

<sup>i</sup> Include Ala; Asp; Glu; Gly; Pro; Ser; Tyr.

Rodríguez *et al.* (2001) indicated that the SAB contained more Leu, Ile, Lys and Phe and less Ala, Val and Met than in LAB. Yang *et al.* (2001) reported differences in the AA profile between LAB and SAB for most of the AA studied, with exceptions for Leu and Thr. Limited information in the literature indicates that differences in AA profiles between LAB and SAB are not always consistent in number and type of AA (Martin *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.* 2000; Yang *et al.*, 2001), and our results (Rodríguez, Calsamiglia, and Ferret, unpublished), including this study, support this observation. From available data, it can be concluded that major differences in the AA profile of LAB and SAB correspond to the proportion of Phe (in four out of five studies), and Ala, Met, Lys, and His (in three out of five studies).

Martin *et al.* (1996) indicated that the differences in AA content between LAB and SAB may be attributed at different techniques used to isolate the different bacterial fractions, differences in bacterial species present, or most likely to a higher feed particle contamination in SAB than in LAB. Rodríguez *et al.* (2000) and Yang *et al.* (2001) also suggested that difference could also reflect different microbial species and stages of growth of rumen bacteria.

The pH affected the AA profile (gAA/100 g AA) of some essential AA (EAA) of LAB and SAB (Table 6). Bacteria obtained from fermenters maintained at pH 5.5 had lower Thr and higher Arg and His concentrations compared with pH 6.5, although differences in the total EAA concentrations were not significant. The content of Ser, Gly, Pro and Tyr also were affected by pH and bacterial group used for calculations. In LAB, the content of Ser was higher and that of Gly was lower at pH 5.5 compared with pH 6.5. Whereas in SAB, the content of Ser and Pro was higher and that of Gly and Tyr was lower at pH 5.5 compared with pH 6.5.

High levels of concentrate in ruminant diets resulting in a reduction in ruminal pH *in vivo* (Russell and Wilson, 1996; Sauvant *et al.*, 1999). However, their effects on the AA profile of bacteria are not known. Yang *et al.* (2001) used two levels of forage to concentrate ratio diets (35:65 and 55:45 for low and high, respectively) in lactating dairy cattle, and observed no major differences in the

AA profile of LAB and SAB. Only the proportion (mol AA/100 mol AA) of Cys and Val in bacteria were different between the high and the low forage to concentrate ratio diets. Results of the present experiment indicate that the content of some microbial AA may be affected by factors other than the type of diet (i.e. pH). However, the magnitude of the difference in AA profile between LAB and SAB with changes in pH was numerically less important.

Table 5. Effect of pH and dilution rate on effluents amino acid flow (g/d) in continuous culture

Amino acid	pH <sup>a</sup>		DR <sup>b</sup>		SEM <sup>c</sup>	Effect <sup>d</sup> ( $P < $ )	
	5.5	6.5	FSDR	SSDR		pH	DR
Aspartic acid	1.85	1.90	1.88	1.87	0.06	NS	NS
Glutamic acid	2.17	2.15	2.22	2.10	0.08	NS	NS
Serine	0.90	0.88	0.90	0.88	0.03	NS	NS
Threonine	0.88	0.94	0.90	0.91	0.02	NS	NS
Glycine	0.90	0.95	0.92	0.92	0.03	NS	NS
Alanine	1.22	1.27	1.25	1.24	0.04	NS	NS
Arginine	0.93	0.92	0.97	0.88	0.06	NS	NS
Proline	0.75	0.72	0.75	0.72	0.03	NS	NS
Valine	0.96	1.01	1.00	0.97	0.02	NS	NS
Methionine	0.25	0.30	0.27	0.28	0.02	*	NS
Isoleucine	0.80	0.80	0.81	0.78	0.02	NS	NS
Leucine	1.40	1.31	1.39	1.32	0.06	NS	NS
Phenylalaline	0.79	0.80	0.81	0.78	0.06	NS	NS
Lysine	0.89	0.84	0.90	0.88	0.03	NS	NS
Histidine	0.33	0.32	0.33	0.32	0.03	NS	NS
Tyrosine	0.68	0.69	0.67	0.70	0.02	NS	NS
Essential <sup>e</sup>	7.24	7.30	7.40	7.13	0.02	NS	NS
Nonessential <sup>f</sup>	8.47	8.57	8.66	8.43	0.24	NS	NS
Total	15.71	15.84	16.00	15.56	0.27	NS	NS

<sup>a</sup> pH = High= 6.5; Low = 5.5.

<sup>b</sup> DR = dilution rate: FSDR = fast solid dilution rate and SSDR = slow solid dilution rate.

<sup>c</sup> Standard error of the mean.

<sup>d</sup> pH and dilution rate effect: NS = not significant; \*  $P < 0.05$ .

<sup>e</sup> Include Thr; Arg; Val; Met; Ile; Leu; Phe; Lys; His.

<sup>f</sup> Include Ala; Asp; Glu; Gly; Pro; Ser; Tyr.

The reduction in the solid dilution rate from 10 to 4%/h also resulted in changes in some microbial AA profile (Table 6). The AA profile of bacteria differed in five out of nine EAA when comparing the two solid dilution rates ( $P < 0.05$ ), although the differences were dependent on the microbial population used for calculations. In general, the content (gAA/100 gAA) of Arg, Val, Ile, and Leu were higher, but Met was lower, for SSSDR than for FSSDR in SAB. The higher difference was observed in the Ile content, which was 27.7% higher at FSSDR compared to SSSDR. Whereas in LAB, only the Ile content differed between FSSDR and SSSDR. The higher error in the estimations of LAB was likely responsible for the lack of significance between treatments, because the numerical differences in the AA profiles of LAB was very similar when compared with SAB. The total estimated EAA content were higher in SSSDR compared with FSSDR fermenters when SAB instead of LAB were used for calculations.

The reduction in the solid dilution rate has often been associated with an increase in DM and fiber digestibility (Hoover *et al.*, 1982) and a lower flow and efficiency of microbial protein synthesis (Hoover and Miller, 1992), which agrees with our results (Tables 1 and 3). The improvement in the efficiency is related to the selection of microbial populations with a high replication rate, which results in a dilution in the maintenance requirements (Owen and Isaacson, 1977). These same changes are likely responsible for the changes in the contribution of different types of bacteria to the flow of microbial protein and, therefore, to the flow of microbial AA.

*Bacterial Amino Acid Flow.* The bacterial AA flow was calculated as:

$$\text{g AA/d} = \text{g AA/g DM}_{\text{bact}} \times \text{g bact/d}$$

where g AA/g DM was the AA content expressed in DM basis for LAB and SAB, and g bact/d was the amount of bacterial DM synthesized daily.



Table 6. Effect of pH and dilution rate on amino acid profile (g/100g AA) of liquid and solid associated bacteria in continuous culture.

Amino acid <sup>a</sup>		pH <sup>b</sup>		DR <sup>c</sup>		SEM <sup>d</sup>	Effect <sup>e</sup> ( $P < $ )	
		5.5	6.5	FSDR	SSDR		pH	DR
Aspartic acid,	LAB	11.2	11.3	11.2	11.4	0.37	NS	NS
	SAB	10.9	11.2	11.7	10.5	0.26	NS	*
Glutamic acid,	LAB	8.8	8.9	9.1	8.6	0.16	NS	*
	SAB	8.9	8.8	9.3	8.4	0.12	NS	***
Serine,	LAB	5.7	5.6	5.5	5.7	0.05	*	*
	SAB	5.7	5.5	5.6	5.7	0.03	**	NS
Threonine,	LAB	5.7	6.2	5.9	6.0	0.06	***	NS
	SAB	5.7	6.1	5.9	5.9	0.05	***	NS
Glycine,	LAB	9.9	10.2	10.0	10.1	0.08	*	NS
	SAB	9.9	10.2	10.1	9.9	0.05	**	**
Alanine,	LAB	12.2	12.3	12.4	12.1	0.13	NS	NS
	SAB	12.2	12.4	12.7	11.9	0.10	NS	***
Arginine,	LAB	3.6	3.3	3.4	3.6	0.06	**	NS
	SAB	3.7	3.3	3.4	3.6	0.04	***	*
Proline,	LAB	4.2	4.2	4.3	4.1	0.11	NS	NS
	SAB	4.3	4.2	4.3	4.3	0.04	*	NS
Valine,	LAB	4.9	5.2	5.1	5.0	0.13	NS	NS
	SAB	5.0	5.2	4.8	5.3	0.10	NS	*
Methionine,	LAB	1.3	1.3	1.2	1.4	0.07	NS	NS
	SAB	1.3	1.2	1.2	1.3	0.07	NS	NS
Isoleucine,	LAB	3.9	4.2	3.7	4.5	0.22	NS	*
	SAB	3.9	4.2	3.4	4.7	0.18	NS	***
Leucine,	LAB	5.9	5.8	5.9	5.9	0.13	NS	NS
	SAB	6.1	5.9	5.8	6.3	0.09	NS	**
Phenylalanine,	LAB	3.3	3.4	3.3	3.3	0.05	NS	NS
	SAB	3.4	3.4	3.4	3.5	0.04	NS	NS
Lysine,	LAB	11.4	11.1	11.4	11.1	0.26	NS	NS
	SAB	11.2	10.7	10.6	11.2	0.20	NS	†
Histidine,	LAB	3.1	2.6	2.9	2.9	0.06	***	NS
	SAB	3.2	2.7	3.1	2.9	0.07	***	*
Tyrosine,	LAB	4.7	4.6	4.7	4.6	0.09	NS	NS
	SAB	4.5	4.8	4.6	4.6	0.05	**	NS
Essential <sup>f</sup>	LAB	43.1	42.9	42.7	43.3	0.63	NS	NS
	SAB	43.4	42.8	41.6	44.6	0.41	NS	***
Non essential <sup>g</sup>	LAB	56.8	57.1	57.2	56.7	0.63	NS	NS
	SAB	56.6	57.2	58.3	55.4	0.41	NS	***

<sup>a</sup> Amino acid profile of liquid (LAB) or solid (SAB) associated bacteria.

<sup>b</sup> pH = High= 6.5; Low = 5.5.

<sup>c</sup> DR = dilution rate: FSDR = fast solid dilution rate and SSDR = slow solid dilution rate.

<sup>d</sup> Standard error of the mean.

<sup>e</sup> pH and dilution rate effect: NS = not significant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>f</sup> Include Thr; Arg; Val; Met; Ile; Leu; Phe; Lys; His.

<sup>g</sup> Include Ala; Asp; Glu; Gly; Pro; Ser; Tyr.

There were no differences in the flow of AA from microbial origin between LAB and SAB (Table 7). The lack of effect in the flow of AA between LAB and SAB were attributed to the small differences observed in their estimated microbial protein synthesis and AA profiles (Table 4). Very few comparisons of estimates of microbial AA flow using LAB or SAB are available in the literature, and available data did not allow to reach a valid conclusion. Klusmeyer *et al.* (1991) reported differences in the calculated amount of EAA from bacteria passing to the duodenum depending on the bacterial group used in calculations (mixed, LAB and SAB), and were attributed to differences in the AA profile of the different bacterial populations. However, results of research conducted in our laboratory (Rodríguez, Calsamiglia and Ferret, unpublished), indicated large differences in the flow of AA from of microbial origin (14 out of 16 AA measured) when LAB or SAB composition data were used, and variation was mainly attributed to differences in the estimation of microbial protein synthesis using LAB or SAB, more than changes in their AA profile. On the contrary, results of this experiment indicate that the estimated flow of microbial AA was independent of the microbial population used as reference. This inconsistency among results is an indication of the lack of data in the literature that allows to estimate the amino acid flow of microbial origin using the composition of LAB and SAB. It also reinforces the recommendations of Martin *et al.* (1996), which indicate the need to improve the accuracy of measuring the total and partial contribution of each microbial fraction to AA passage to the SI.

The pH had no effect on the estimated flow of AA (Table 8), and may be attributed to the lack of effect of pH on the flow of microbial N and on the AA profile (Tables 3 and 6).

The change of solid dilution rate from 10 to 4%/h resulted in differences in the estimated flow of AA from microbial origin in 11 out of the 16 AA measured. The number of AA that changed were dependent of the microbial population used for calculations. In LAB, the flow (g/d) of Glu, Arg, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His, and Tyr were higher ( $P < 0.05$ ) and that of Ser, Thr, Gly, and Ala tended to be higher ( $P < 0.10$ ) in FSDR compared with SSDR. In SAB, only the flow of Met,

Ile and Lys was higher ( $P < 0.05$ ), and that of Glu, Arg, Val, Leu, His and Tyr tended to be higher ( $P < 0.10$ ) in FSDR compared with SSDR. In general, the flow of the total, essential ( $P < 0.05$ ) and non essential ( $P < 0.10$ ) AA of microbial origin were higher in FSDR compared with SSDR, when LAB were used for calculations. When SAB were used, total and essential AA only tended to be higher ( $P < 0.10$ ) in FSDR compared with SSDR.

Table 7. Differences in amino acid flow (g/d) of microbial origin between solid and liquid associated bacteria in continuous culture.

Amino acid flow, g/d	Bacteria <sup>a</sup>		SEM <sup>b</sup>	Effect <sup>c</sup> ( P < )
	LAB	SAB		
Aspartic acid	0.96	1.00	0.05	NS
Glutamic acid	1.24	1.28	0.03	NS
Serine	0.49	0.50	0.01	NS
Threonine	0.59	0.60	0.01	NS
Glycine	0.50	0.50	0.01	NS
Alanine	0.78	0.79	0.02	NS
Arginine	0.57	0.58	0.01	NS
Proline	0.29	0.30	0.01	NS
Valine	0.73	0.74	0.01	NS
Methionine	0.28	0.28	0.01	NS
Isoleucine	0.68	0.68	0.01	NS
Leucine	0.81	0.84	0.02	NS
Phenylalaline	0.47	0.48	0.01	NS
Lysine	0.94	0.94	0.01	NS
Histidine	0.19	0.19	0.01	NS
Tyrosine	0.54	0.54	0.01	NS
Essential <sup>d</sup>	5.25	5.33	0.09	NS
Nonessential <sup>e</sup>	4.80	4.90	0.07	NS
Total	10.05	10.24	0.16	NS

<sup>a</sup> Liquid (LAB) and solid (SAB) associated bacteria

<sup>b</sup> Standard error of the mean of differences between SAB-LAB

<sup>c</sup> Differences between SAB-LAB effect for each variable: NS = not significant

<sup>d</sup> Include Thr; Arg; Val; Met; Ile; Leu; Phe; Lys; His

<sup>e</sup> Include Ala; Asp; Glu; Gly; Pro; Ser; Tyr

Table 8. Effect of pH and dilution rate on amino acid flow (g/d) of liquid and solid associated bacteria in continuous culture.

Amino acid <sup>a</sup>		pH <sup>b</sup>		DR <sup>c</sup>		SEM <sup>d</sup>	Effect <sup>e</sup> ( <i>P</i> < )	
		5.5	6.5	FSDR	SSDR		pH	DR
Aspartic acid,	LAB	0.97	0.96	1.04	0.88	0.11	NS	NS
	SAB	0.99	1.01	1.10	0.90	0.13	NS	NS
Glutamic acid,	LAB	1.21	1.27	1.50	0.98	0.17	NS	*
	SAB	1.27	1.29	1.50	1.05	0.17	NS	†
Serine,	LAB	0.48	0.40	0.58	0.40	0.06	NS	†
	SAB	0.49	0.50	0.57	0.41	0.06	NS	NS
Threonine,	LAB	0.57	0.61	0.70	0.48	0.08	NS	†
	SAB	0.58	0.62	0.69	0.51	0.08	NS	NS
Glycine,	LAB	0.48	0.51	0.59	0.40	0.06	NS	†
	SAB	0.50	0.51	1.58	0.43	0.07	NS	NS
Alanine,	LAB	0.75	0.80	0.93	0.63	0.11	NS	†
	SAB	0.78	0.80	0.91	0.66	0.11	NS	NS
Arginine,	LAB	0.56	0.58	0.70	0.44	0.07	NS	*
	SAB	0.59	0.57	0.69	0.47	0.07	NS	†
Proline,	LAB	0.28	0.30	0.32	0.26	0.03	NS	NS
	SAB	0.30	0.30	0.31	0.28	0.03	NS	NS
Valine,	LAB	0.70	0.75	0.89	0.56	0.10	NS	*
	SAB	0.73	0.75	0.88	0.60	0.10	NS	†
Methionine,	LAB	0.27	0.28	0.36	0.19	0.05	NS	*
	SAB	0.28	0.29	0.36	0.20	0.04	NS	*
Isoleucine,	LAB	0.66	0.69	0.86	0.50	0.09	NS	*
	SAB	0.67	0.69	0.85	0.52	0.09	NS	*
Leucine,	LAB	0.79	0.84	1.00	0.62	0.11	NS	*
	SAB	0.84	0.83	0.99	0.68	0.11	NS	†
Phenylalanine,	LAB	0.45	0.49	0.57	0.36	0.06	NS	*
	SAB	0.49	0.48	0.56	0.40	0.06	NS	NS
Lysine,	LAB	0.93	0.95	1.16	0.72	0.14	NS	*
	SAB	0.94	0.95	1.15	0.73	0.14	NS	*
Histidine,	LAB	0.18	0.19	0.23	0.14	0.03	NS	*
	SAB	0.20	0.18	0.22	0.15	0.03	NS	†
Tyrosine,	LAB	0.54	0.54	0.67	0.41	0.08	NS	*
	SAB	0.52	0.56	0.67	0.42	0.08	NS	†
Essential <sup>f</sup>	LAB	5.11	5.38	6.47	4.02	0.72	NS	*
	SAB	5.31	5.35	6.40	4.26	0.73	NS	†
Non essential <sup>g</sup>	LAB	4.71	4.89	5.64	3.95	0.61	NS	†
	SAB	4.84	4.96	5.64	4.16	0.66	NS	NS
Total	LAB	9.82	10.27	12.11	7.98	1.33	NS	*
	SAB	10.15	10.32	12.04	8.43	1.38	NS	†

<sup>a</sup> Amino acid flow using liquid (LAB) or solid (SAB) associated bacteria.

<sup>b</sup> pH = High= 6.5; Low = 5.5.

<sup>c</sup> DR = dilution rate: FSDR = fast solid dilution rate and SSDR = slow solid dilution rate.

<sup>d</sup> Standard error of the mean.

<sup>e</sup> pH and dilution rate effect: NS = not significant; † *P* < 0.10; \* *P* < 0.05.

<sup>f</sup> Include Thr; Arg; Val; Met; Ile; Leu; Phe; Lys; His.

<sup>g</sup> Include Ala; Asp; Glu; Gly; Pro; Ser; Tyr

The estimated flow of each individual AA of microbial origin is largely dependent on the measurements of AA concentration (profile) and the estimated flow of microbial DM (synthesis). Therefore, the larger differences in the microbial AA flow observed between FSDR and SSDR may be related with differences in the estimated microbial synthesis (representativeness of the microbial sample and accuracy of the analysis of microbial marker) more than with differences in the microbial AA profile (Table 6). Also, the higher bacterial AA flow (total, essential and non essential) at faster solid dilution was consistent with lower dietary N flow and higher protein degradation (Table 3).

If results of bacterial AA flows of this experiment are compared with results of other research conducted in our laboratory (Rodríguez, Calsamiglia and Ferret, unpublished), where main factors evaluated were fiber level and particle size, it may be observed that the interpretation of the results change according the microbial population used for calculations. In this experiment, the AA flow estimation was higher in FSDR compared to SSDR when LAB were used for calculation, whereas in the other experiment, the higher microbial AA flow was obtained in high fiber compared to low fiber diet, when SAB instead of LAB were used for calculations.

### **Implications**

Low pH and fast solid dilution rate conditions were characterized by lower DM, OM and fiber digestion. The VFA production and concentration were more affected by pH than by dilution rate. Low pH conditions, independently of other factors, caused a reduction in total VFA production, in the acetate and branched-chain VFA proportion, and in the acetate to propionate ratio, as well and an increase in propionate proportion. The ammonia N concentration, and ammonia and non ammonia N flow were affected by pH but not by dilution rate. However, the effect of pH and dilution rate on microbial and dietary N flow, protein degradation, and efficiency of microbial protein synthesis were dependent on the microbial population used for calculations. There were no important changes in

the profile and estimated flow AA between liquid and solid associated bacteria, but there were important effects of pH and dilution rate on microbial AA profile, and of the dilution rate on the estimation of microbial AA flow, although the magnitude of these differences were dependent of bacterial group used for calculations.

### **Literature Cited**

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Balcells, J. J., J. M. Guada, J. M. Peiró, and D. S. Parker. 1992. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575:153-157.
- Calsamiglia, S., A. Ferret, and M. Devant. 2002. Effect of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:574-579.
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. C. Gay, and L. L. Berger. 1990. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency and isolation techniques. *J. Dairy Sci.* 73:2480-2488.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Clark, J. H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 75:2304-2323.
- Craig, W. M., G. A. Broderick, and D. B. Ricker. 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.*, 117:56-62.

- Crawford, R. J., W. H. Hoover, and P. H. Knowlton. 1980a. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fiber digestion, VFA production and protozoa number. *J. Anim. Sci.* 51:975-986.
- Crawford, R. J., W. H. Hoover, and L. L. Junkins. 1980b. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. II. Nitrogen partition and efficiency of microbial synthesis. *J. Anim. Sci.* 51:986-995.
- Czerkawski, J. W. 1976. Chemical composition of microbial matter in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 27:621-632.
- De Veth, M. J., and E. S. Kolver. 2001. Digestion of Ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 84:1449-1457.
- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, and J. Gasa. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78:1667-1676.
- Erfle, J. D., R. J. Boila, R. M. Teather, S. Mahadevan, and F. D Sauer. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 65:1457-1464.
- Faichney, G. J. 1993. Digesta flow. Pages 53-85 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755-2766.
- Hoover, W. H., and T. K. Miller. 1992. Rumen digestive physiology and microbial ecology. Bulletin 708T of the Agriculture and Forestry Experimental Station. West Virginia University, USA. 36 pp.
- Hoover, W. H., P. H. Knowlton, M. D. Stern, and C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous culture of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:535-542.

- Hoover, W. H., R. J. Crawford, Jr., and M. D. Stern. 1982. Effects of solid and liquid flows on fermentation in continuous culture. III. Solid retention time. *J. Anim. Sci.* 54:849-854.
- Hoover, W. H., C. R. Kincaid, G. A. Varga, W. V. Thaine, and L. L. Junkin, Jr. 1984. Effects of solid and liquid flows on fermentation in continuous culture. IV. pH and dilution rate. *J. Anim. Sci.* 58:692-699.
- INRA. 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. R. Jarrige (éd). INRA, Paris, France.
- Isaacson, H. R., F. C. Hinds, M. P. Bryant, and F. N. Owen. 1975. Efficiency of energy utilization by mixed ruminal bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 58:1645-1659.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobics fermentor content. *Sci. Aliments* 2:131-144.
- Klusmeyer, T. H., M. W. Ohl, and J. H. Clark. 1991. Effect of using particle-associated (PAB), fluid associated (FAB) or mixed rumen bacteria (MB) for calculating nutrient flow to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74(Suppl. 1):248(Abstr).
- Lallès, J. P., C. Poncet, and R. Toullec. 1992. Composition en acides amines des bactéries libres et des bactéries fixées aux particules alimentaires du retículo-rumen du veau sevré et du mouton recevant différentes rations. *Ann. Zootech.* 41:75-76.
- Lana, R. P., J. B. Russell, and M. E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76:2190-2196.
- Legay-Carmier, F., and D. Bauchart. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. *Br. J. Nutr.* 61:725-740.



- Martin, C., A. G. Williams, and B. Michalet-Doreau. 1994. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal content. *J. Anim Sci.* 72:2962-2968.
- Martin, C. L. Bernard, and B. Michalet-Doreau. 1996. Influence of sampling time and diet on amino acid composition of protozoa and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *J. Anim. Sci.* 74:1157-1163.
- Meng, Q., M. S. Kerley, P. A. Ludden, and R. L. Belyea. 1999. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 77:206-214.
- Minato, H., and T. Suto. 1978. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder *in vitro* and elution of bacteria attached therefrom. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24:1-16.
- Mould, F. L., E. R. Ørskov, and S. O. Mann. 1984. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> edition National Academic Press, Washington, DC.
- O'Connor, J. D., C. J. Sniffen, D. G. Fox., and W. Chalupa. 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV Predicting amino acid adequacy. *J. Dairy Sci.* 71:1298-1311.
- Olubobokun, J. A., and W. M. Craig. 1990. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 68:3360-3370.
- Olubobokun, J. A., W. M. Craig, and W. A. Nipper. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 66:2701-2710.

- Ørskov, E. R. 1988. Nutrición proteica de los rumiantes. Editorial Acribia. Zaragoza- España.
- Owen, F. N., and H. R. Isaacson. 1977. Ruminant microbial yield: factors influencing synthesis and bypass. Federation Proceeding. 36:198-202.
- Pérez, J. F., J. Balcells, M. Fondevila, and J. A. Guada. 1998. Composition of liquid- and particle-associated bacteria and their contribution to the rumen outflow. Aus. J. Agric. Res. 49:907-914.
- Rodríguez, C. A., J. González, M. R. Alvir, J. L. Repetto, C. Centeno, and F. Lamrani. 2000. Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. Br. J. Nutr. 84:369-376.
- Russell, J. B., and D. B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 39:604-610.
- Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. J. Dairy. Sci. 79:1503-1509.
- Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. Br. J. Nutr. 32:199-208.
- Sauvant, D., F. Meschy, and D. Mertens. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. INRA Prod. Anim. 12:49-60.
- Schadt, I., W. H. Hoover, T. K. Miller, W. V. Thayne, and G. Licitra. 1999. Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. J. Anim. Sci. 77:485-491.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, and W. V. Thaine. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. J. Dairy Sci. 69:413-419.
- Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1988. Bioestadística: principios y procedimientos. 2ª Edición. McGraw-Hill. Inc. USA.

- Storm, E., and E. R. Ørskov. 1983. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminant. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. *Br. J. Nutr.* 50:463-470.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3588-3597.
- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Second Edition. Comstock Publishing associates. Cornell University Press. USA.
- Vendrell, J., and F. X. Avilés. 1986. Complete amino acid analysis of protein by dabsyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 358:401-413.
- Wallace, R. J., and M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pages 217-249 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson (Eds). Elsevier Applied Science, London, United Kingdom.
- Weller, R. A., and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32:341-351.
- Whitehouse, N. L., V. M. Olson, C. G. Schwab, W. R. Chesbro, K. D. Cunningham, and K. D. Lycos. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72:1335-1343.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2736–2746.

## CAPÍTULO 5

### **Análisis y Discusión General de Resultados**

## 1. El sistema de cultivo continuo de flujo doble

Los experimentos descritos en el presente trabajo formaron parte del proyecto titulado “*Desarrollo de un sistema de cultivo continuo de flujo doble para el estudio de la fermentación ruminal: Estudio de los factores que afectan el flujo de aminoácidos al intestino del rumiante*”, financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Proyecto AGF97/0444, CICYT). El desarrollo de este nuevo sistema de estudio permitió el inicio de una nueva línea de investigación en el *Departament de Ciència Animal i dels Aliments* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, sobre el estudio *in vitro* de factores que afectan a la fermentación microbiana ruminal y al flujo post-ruminal de nutrientes. Entre los principales objetivos del proyecto estaba el desarrollo y puesta a punto del sistema. Esta fue la motivación que condujo a la ejecución del primer experimento.

Las técnicas de cultivo continuo constituyen una manera singular, rápida, económica y bastante completa de obtener información acerca de cómo un tratamiento puede afectar o modificar la fermentación microbiana del rumen. El sistema ocupa un nicho en el campo de la investigación que se sitúa a medio camino entre los cultivos puros o los cultivos mixtos en sistemas cerrados y los datos obtenidos *in vivo* con animales. Los sistemas de cultivo continuo tienen dos utilidades principales: 1) la valoración de alimentos y aditivos utilizados en las dietas de rumiantes; 2) El estudio y cuantificación del efecto de un determinado factor (como el tipo de dieta, el pH, la tasa de dilución,...) de forma aislada, manteniendo el resto de factores constantes. Este aspecto es relevante en el desarrollo de modelos mecanísticos donde se requiere cuantificar los efectos de los distintos factores que describen el comportamiento de una determinada variable. Estos modelos matemáticos permiten integrar el conocimiento de varios componentes de un sistema para tener una visión global y comprender su funcionamiento (Dijkstra y Bannink, 2000). En la mayoría de los casos, los datos utilizados para construir el modelo provienen de experimentos realizados *in vitro* o *in situ*. Una vez que el efecto se conoce o es cuantificado,

éste puede ser incorporado en las ecuaciones de predicción para simular el comportamiento global del sistema.

Uno de los objetivos principales de la presente investigación fue el estudio de los factores que afectan al perfil y flujo de aminoácidos de origen microbiano al intestino delgado de los rumiantes, utilizando muestras bacterianas obtenidas de las fracciones líquida (BL) y sólida (BS) del contenido del fermentador. El sistema de cultivo continuo de flujo doble constituye un modelo ideal para aislar y estudiar los factores que afectan a la fermentación ruminal y a la predicción del flujo de AA absorbibles en el rumiante.

Los nuevos sistemas de formulación proteica para el vacuno lechero han incorporado los conceptos de proteína digestible en el intestino (INRA, 1988) y el aporte de aminoácidos al intestino delgado del rumiante (O'Connor *et al.*, 1993; Rulquin y Verité, 1993; NRC, 2001) como criterio de formulación. La mejora en la predicción del flujo de AA en los modelos mecanísticos (O'Connor *et al.*, 1993) y matemáticos (Baldwin y Argyle, 1988) se basa en el aislamiento y cuantificación de los factores que lo afectan. El flujo total de AA al intestino delgado del rumiante corresponde a la sumatoria de los AA provenientes de la proteína de la dieta, la proteína microbiana y los aportes endógenos (Cecava *et al.*, 1990; Clark *et al.*, 1992). Numerosos factores pueden afectar y modificar los aportes de cada una de estas fracciones individuales. Algunos resultados obtenidos *in vivo* (McCarthy *et al.*, 1989; Erasmus *et al.*, 1994) indican que el flujo de AA al intestino delgado puede variar con el tipo de dieta o suplemento proteico suministrado. Sin embargo, es difícil indicar si dichos cambios ocurren debido al efecto directo de la dieta o si se producen como consecuencia de los cambios que ocurren de forma paralela en el medio ruminal (pH, tasa de dilución, ...). Además, la variabilidad entre animales es usualmente tan elevada que frecuentemente no es posible llegar a conclusiones claras sobre el efecto de cada factor de forma individual. En estas situaciones, los sistemas *in vitro* constituyen una herramienta valiosa que permite estudiar cada factor de forma aislada.

El sistema de cultivo continuo instalado y utilizado en el *Departament de Ciència Animal i dels Aliments* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, consiste en ocho fermentadores que fueron modificados a partir del modelo propuesto por Hoover *et al.* (1976), y ha sido descrito por Calsamiglia *et al.* (2002). Las modificaciones más relevantes consistieron en la instalación de un sistema de control automatizado de temperatura, pH y suministro de alimento. El control de temperatura se realiza mediante un termopar T y una resistencia (70W). El control de pH se realiza con un pH-metro transmisor y dos mini-bombas peristálticas que infunden ácido o base. El alimento se suministra de forma semi-continua con un alimentador de pistones. El control de dichos parámetros en las ocho unidades que conforman el sistema de cultivo continuo se realiza a través de un ordenador y un PLC (Field Point, National Instruments, USA). La programación de los controles de temperatura, pH y alimentación se realiza a través de un programa informático LawView (LawView, USA). Posteriormente se realizaron algunos ajustes adicionales, tales como el cambio de las aspas del agitador por unas de mayor tamaño con el fin de evitar problemas en el mezclado, con lo cual se redujo el volumen final del fermentador (de 1,400 a 1,320 mL en promedio) y el tipo de la malla utilizada en la elaboración de los filtros (de 100 a 50 mesh), para evitar el taponamiento de los mismos.

Para el estudio de la fermentación microbiana y el flujo post-ruminal de nutrientes, además de la puesta a punto del sistema de fermentadores se pusieron a punto otras técnicas experimentales y de análisis. Entre ellas cabe destacar las técnicas utilizadas en el procesado y posterior análisis de las muestras de efluentes y de bacterias, como son el proceso de liofilización, determinación del contenido en bases púricas, N amoniacal, ácidos grasos volátiles, aminoácidos, etc.

Con la realización del primer experimento se pudo, además, comprobar la viabilidad de obtener suficiente muestra de las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida del contenido del fermentador en cantidad suficiente (establecida en un mínimo de 1 g de MS bacteriana), que permitiese realizar los

análisis correspondientes: contenido de MS, cenizas, proteína bruta, bases púricas y perfil de aminoácidos. Para la obtención de los aislados bacterianos de la fracción sólida de la digesta se utilizó una combinación de métodos de separación basado en los resultados obtenidos por Whitehouse *et al.* (1994) y, que se presenta de forma esquematizada en la Figura 1.

Se evitó el uso de agentes químicos, tales como: formaldehído, tween 80, metanol, butanol terciario; exposición a pH bajo; o el uso de tratamientos físicos como la homogenización vigorosa (Waring blender). Las razones que prevalecieron en la toma de esta decisión fue reducir el riesgo de provocar cambios en la estructura celular que pudieran ocasionar la ruptura o lisis bacteriana, con la subsiguiente pérdida de contenido celular.

Whitehouse *et al.* (1994) basándose en las observaciones de Harold (1970), señalaron que el uso de alcoholes puede provocar una desorganización de la estructura de los lípidos de la membrana celular. Además, los resultados obtenidos con fermentadores semi-continuos (Rusitec) por Ranilla *et al.* (2001) indican que el porcentaje de desligamiento bacteriano no se incrementó cuando se comparó el uso de metanol o butanol terciario con respecto al tratamiento control (combinación de metilcelulosa, agitación, cambios de temperatura y pH bajo). El uso de formaldehído tampoco es recomendable debido a su potencial efecto sobre la composición de aminoácidos de las bacterias (Barry, 1976; Stern *et al.*, 1983; Whitehouse *et al.*, 1994), aunque Broderick y Merchen (1992) recomiendan su uso para prevenir la lisis celular cuando el aislamiento bacteriano no se realiza inmediatamente después del muestreo.

También se ha sugerido que la incubación de los residuos sólidos en soluciones con pH bajo pueden favorecer el desligamiento de las bacterias adheridas de la fracción sólida (Smith *et al.*, 1973; Cheng *et al.*, 1980; Shriver *et al.*, 1986), por lo cual se incluye en los protocolos seguidos por varios autores (Whitehouse *et al.*, 1994; Ranilla *et al.*, 2001). Sin embargo, su uso fue descartado en el protocolo de los experimentos aquí descritos, por considerar que podría interferir con los resultados obtenidos, ya que en el Experimento 3 la reducción del pH, aunque moderada, era una de las variables de estudio.



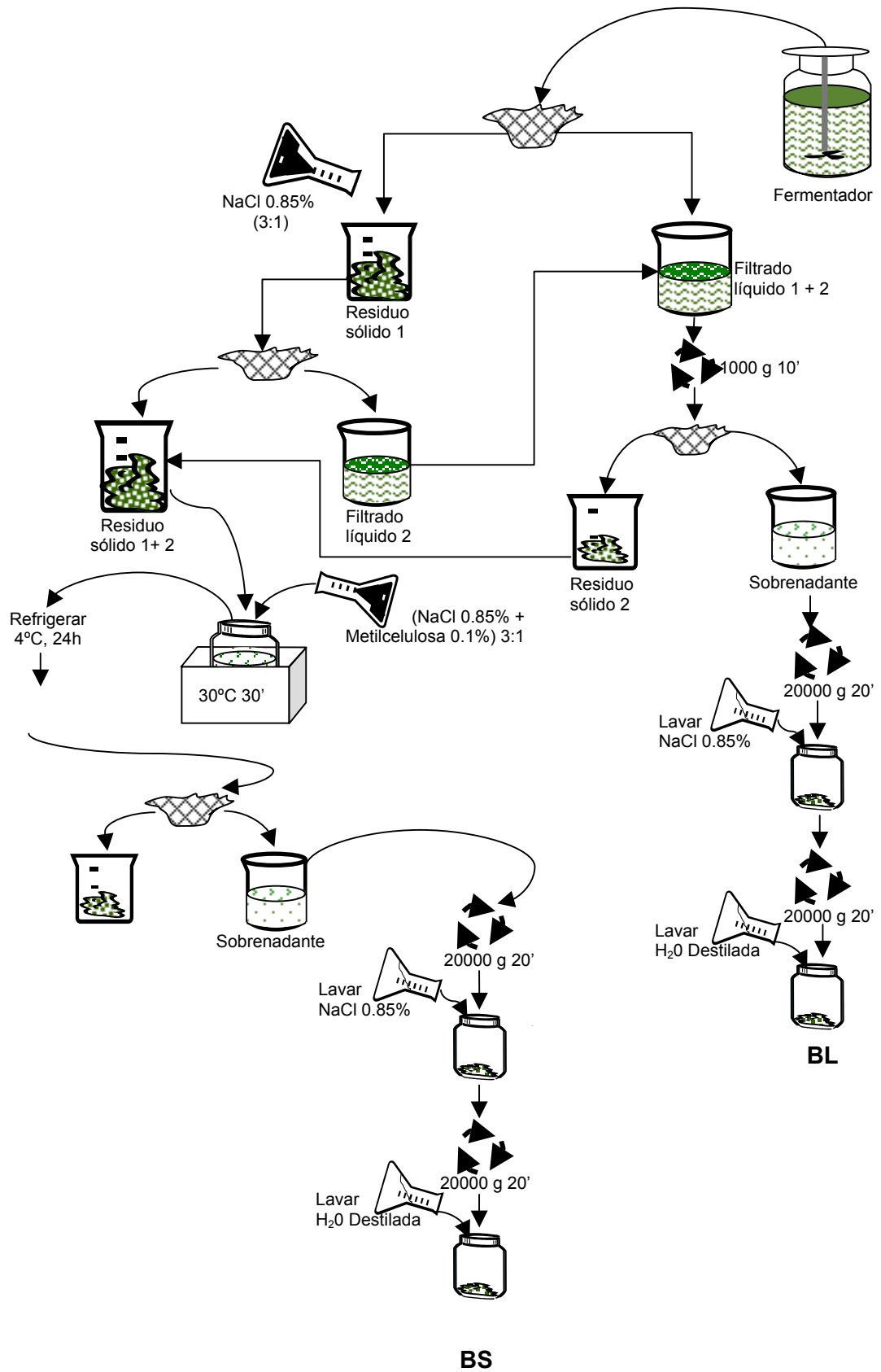


Figura 1. Procedimiento utilizado para el aislamiento de las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida del contenido del fermentador.

## 2. Coeficientes de digestibilidad

La digestibilidad de las distintas fracciones del alimento (MS, MO y fibra) está influenciada por factores tales como el nivel de ingestión, el nivel de fibra en la dieta o la relación forraje:concentrado, el grado de procesamiento o la forma de presentación, las pautas de alimentación, etc. (Fahey *et al.*, 1993; Khorasani *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001a). El estudio del efecto que cada uno de esos factores ejerce sobre la digestibilidad *in vivo* es difícil de evaluar, ya que la modificación de uno de estos factores resulta en otros cambios simultáneos en la dinámica de la fermentación ruminal que confunden la interpretación de los resultados. Por ejemplo, el aporte de elevadas proporciones de carbohidratos no estructurales se relaciona normalmente con una menor digestibilidad de la fibra y una disminución en el pH ruminal, por lo que el efecto del pH y el tipo de dieta están confundidos. Asimismo, otros factores tales como la capacidad tamponante del rumen, los cambios en la tasa de dilución, etc. también pueden provocar efectos confundidos cuando se estudian factores como el tipo de dieta, la forma de presentación de la dieta, el pH, etc. sobre la fermentación ruminal. En estos casos, los experimentos *in vitro* permiten estudiar y cuantificar dichos efectos de forma aislada.

En líneas generales, los coeficientes de digestibilidad real de la MS (DRMS); de la MO (DRMO) y de la fibra (FND, FAD) fueron poco afectados por el tipo de dieta utilizada (Tabla 2, Exp. 1 y 2). La DRMS, DRMO y la digestibilidad de la fibra fue similar en las dietas a base de silo de raygrass (RS) o de maíz (CS) como fuente de forraje en la dieta (Exp. 1). Estos resultados contrastan con los obtenidos *in vitro* por Bernard *et al.* (2002) quienes observaron una mayor digestibilidad de la MS *in vitro* en dietas a base de RS comparado con dietas a base de CS, debido quizás a la mejor calidad del heno de RG utilizado en el experimento por estos autores. El ensilado de raygrass se caracteriza por presentar un mayor rango de valores tanto en la composición química como en los parámetros de degradación ruminal comparado con en ensilado de maíz (INRA, 1988). El mayor contenido en fibra en las dietas a base de RS comparado con las dietas a base de CS (debido a la mayor proporción de

carbohidratos no fibrosos) no se relacionó con diferencias en la digestibilidad de la fibra, lo cual es consistente con las observaciones *in vivo* de Bernard *et al.* (2002), quienes indican que la digestibilidad de la fibra (FND, FAD) prácticamente no se vio afectada por la sustitución de hasta el 100% del CS por RS en la dieta.

Otro factor relacionado con la dieta que puede provocar cambios importantes en la digestibilidad de los nutrientes es la relación forraje:concentrado. En el Exp. 2 se compararon dos niveles de inclusión de fibra en la dieta (67 vs 39 % de heno de alfalfa), y se evaluó el efecto sobre los coeficientes de digestibilidad (MS, MO, fibra, Tabla 2), manteniendo constante el resto de factores (pH, tasa de dilución, nivel de ingestión, ...). Los resultados observados indican que un incremento del 72% en el nivel de fibra en la dieta no se correspondió con cambios importantes en la digestibilidad de la MS, MO o fibra. En estudios realizados *in vivo*, la inclusión de grandes cantidades de concentrado en la dieta se relaciona normalmente, con una disminución en la degradabilidad de la fibra (Reynolds *et al.*, 1991). Así, por ejemplo, Hoover (1986) señala que, si los niveles de inclusión de carbohidratos no fibrosos en la dieta son superiores al 30% de la MS de la dieta, la digestión ruminal de la fibra disminuye. Sin embargo, bajo tales condiciones es difícil determinar si el efecto es debido a la elevada proporción de carbohidratos no estructurales *per se* o si se produce como consecuencia del incremento en el nivel de ingestión, el cambio de los ritmos de paso, o la disminución del pH ruminal. De hecho, Mould *et al.* (1983) y Russell (1998b) demostraron que los cambios post-ingestión observados en el perfil de fermentación cuando se incluyeron cantidades elevadas de concentrado eran debido a la combinación de los efectos del tipo de sustrato y el pH. Es probable que el mantenimiento constante del pH y la tasa de dilución previno cualquier cambio en el patrón de digestión, a pesar de las diferencias entre las dos dietas utilizadas en el experimento.

La degradación de los componentes de la dieta es el resultado de la competición entre el ritmo de degradación y el de paso (Tamminga, 1993). La velocidad de salida de las partículas de alimento desde el rumen esta controlada

por varios factores físicos, de los cuales el tamaño de partículas y la gravedad específica funcional son los más importantes (Lechner-Doll *et al.*, 1991). Datos obtenidos *in vitro* o *in situ* indican que la reducción del tamaño de partícula favorece la digestión de la MS y de la fibra, y el efecto positivo se atribuye a que una mayor superficie queda expuesta para el ataque microbiano (Fahey *et al.*, 1993; Bowman y Firkins, 1993). Sin embargo, la mayoría de resultados obtenidos *in vivo* indican que la reducción del tamaño de partícula se relaciona con una disminución en la digestión de la MS, MO y fibra. Esta contradicción se atribuye a la disminución del tiempo de permanencia de las partículas en el rumen (Grant *et al.*, 1990; Fahey *et al.*, 1993) o a la reducción del pH ruminal debido a una menor actividad de rumia y de producción de saliva (Bourquin *et al.*, 1994). En nuestro caso, la reducción del tamaño de partículas del forraje ( $\geq 3\text{mm}$  vs  $\leq 1\text{mm}$ , Exp. 2, Tabla 2, Capítulo 3) no provocó cambios importantes en los coeficientes de digestibilidad, aunque la digestión de la fibra tendió a ser menor con la disminución del tamaño de partículas del forraje. Probablemente, al igual que se observó con el nivel de fibra en la dieta, el control del pH y la tasa de dilución (líquidos y sólidos) previnieron cualquier cambio en la digestibilidad.

El hecho que ni el nivel de fibra en la dieta ni el tamaño de partículas del forraje afectaran de manera importante a la digestibilidad constituye una importante observación para la modelización, ya que sugiere que los cambios en digestibilidad observada *in vivo* son consecuencia de los cambios en el medio ruminal (pH, tasa de dilución, ...). No obstante, es necesario realizar otros experimentos similares donde se evalúen otros tipos de dieta o niveles crecientes de inclusión de carbohidratos no estructurales en la dieta, con el fin de determinar el efecto real de los mismos e incluirlos en las ecuaciones de predicción que utilizan los modelos de simulación de la respuesta en los rumiantes, al aporte de nutrientes en la dieta.

Las variaciones en el pH y/o en la tasa de dilución de la fracción sólida de la digesta tuvieron un impacto mayor en los coeficientes de digestibilidad (DM, MO y fibra) que las variaciones en aquellos factores relacionados con la dieta (Exp. 3, Tabla 1, Capítulo 4). La reducción del pH de 6.5 a 5.5 y, el aumento en

la tasa de dilución de sólidos de 4%/h a 10%/h resultó en una disminución moderada de la digestión de la MS (DRMS) y de la MO (DRMO), y una reducción severa en la digestión de la fibra (FND, FAD). El efecto negativo que ejerce el pH bajo en la digestión ruminal está bien establecido y ha sido observado tanto en experimentos *in vivo* (Mould *et al.*, 1983) como *in vitro* (Hoover *et al.*, 1984; Shriver *et al.*, 1986; De Veth y Kolver, 2001; Calsamiglia *et al.*, 2002). La reducción severa en la digestibilidad de la fibra se relaciona, probablemente, con una menor actividad de las bacterias celulolíticas cuando el pH es inferior a 6.0 (Erfle *et al.*, 1982; Mould *et al.*, 1983; De Veth y Kolver, 2001). Esta menor actividad celulolítica puede deberse a la reducción en el número o en el ritmo de crecimiento de las bacterias celulolíticas, o con la pérdida de la capacidad de adherencia de las bacterias a la fibra (Russell y Dombroski, 1980; Shriver *et al.*, 1986; Russell y Wilson, 1996; Weimer, 1998). Por otra parte, la menor digestibilidad de la fibra observada cuando la tasa de dilución de sólidos aumentó de 4%/h a 10%/h se atribuye al menor tiempo de exposición de las partículas del alimento al ataque microbiano cuando disminuyó el tiempo de retención de las partículas en el fermentador (Hoover *et al.*, 1982; Schadt *et al.*, 1999).

En líneas generales y, en base a los resultados observados en los 3 experimentos aquí reseñados, se puede concluir que los factores que tuvieron un mayor impacto negativo en la digestión fueron el pH y la tasa de dilución, de los cuales la digestión de la fibra fue el parámetro más afectado.

### 3. Fermentación Ruminal

*Acidos Grasos Volátiles.* La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) en el rumen depende fundamentalmente de la fermentación de carbohidratos (estructurales y no estructurales) y se puede expresar como producción total o como la concentración relativa de los AGV individuales, lo cual se conoce comúnmente como el perfil de fermentación (France y Siddons, 1993).

La producción total de AGV varió entre 61 y 122 mM, e indica que, tanto la proporción como el tipo de carbohidratos aportados difirieron entre las diferentes dietas utilizadas en los 3 experimentos. A pesar de la amplitud en el rango de valores observados, éste es bastante similar a los valores encontrados *in vivo* bajo condiciones normales de alimentación (70 y 130 mM, France y Siddons, 1993), y permite afirmar que las condiciones de fermentación fueron adecuadas. Sin embargo, es importante resaltar que, en experimentos *in vitro*, la producción total de AGV suele ser mayor que en los experimentos *in vivo*, ya que en éstos últimos una cantidad variable, pero importante, se absorbe a través de la pared ruminal, dependiendo de factores como el pH, la cantidad y proporción de AGV producidos y el flujo sanguíneo a través del epitelio ruminal (Van Houtert, 1993, Van Soest, 1994).

A pesar de la variabilidad observada, la producción de AGV fue coherente con el tipo de dieta suministrada y las condiciones de fermentación prevalecientes. Por ejemplo, la mayor producción de AGV totales (122 mM) se observó cuando la dieta suministrada incluyó una elevada proporción de carbohidratos fermentables (Exp. 2, Tabla 3). Por el contrario, la menor producción total de AGV se observó en el Exp. 3 (61.4 mM Tabla 2, Capítulo 4) y es coherente con el menor aporte de alimento a los fermentadores (80 g/d) comparado con los otros dos experimentos (100 y 95 g/d en los Exp. 1 y 2, respectivamente), y las condiciones de pH ruminal bajo. La disminución en la cantidad de alimento suministrado en el Exp. 3 fue necesaria para evitar los problemas de mezclado que se observaron en las pruebas preliminares al disminuir la tasa de dilución de sólidos de 10 a 4%/h.

En cuanto al efecto de los factores principales evaluados en los distintos experimentos, se puede señalar que el incremento en la proporción de carbohidratos no fibrosos en la dieta (HF vs LF) favoreció la producción de AGV (Exp. 2, Tabla 3), dada la mayor fermentabilidad de este tipo de carbohidratos si se compara con las fuentes de carbohidratos fibrosos. Asimismo, el aporte de carbohidratos no fibrosos en la dieta se relaciona, normalmente, con una menor

relación acetato:propionato (Lana *et al.*, 1998; Russell, 1998b), lo cual fue evidente en el Exp. 2 (Capítulo 3, Tabla 3).

La reducción del tamaño de partícula de la fibra no afectó a la producción total de AGV, pero sí a la relación acetato:propionato, la cual se redujo al disminuir el tamaño de partículas de la fibra (Exp. 2, Capítulo 3, Tabla 3). Se ha establecido que la reducción del tamaño de partículas *in vivo* se relaciona con una disminución del tiempo de masticación y de rumia, lo que resulta en una disminución del pH ruminal, de la relación acetato:propionato y del contenido de grasa en la leche (Grant *et al.*, 1990; Bauchemin *et al.*, 1994). Es decir, existe un efecto confundido entre un factor relacionado con la dieta y los cambios paralelos que se suceden en el ambiente ruminal. La disminución en la relación acetato:propionato observado con la reducción del tamaño de partículas se produce normalmente, como consecuencia del incremento en la proporción de propionato a expensas del acetato (Grant *et al.*, 1990; Van Soest, 1994). Los resultados observados en el mencionado experimento (Exp. 2) indican que la reducción se debió a la disminución en la concentración de acetato, y no como consecuencia del incremento en la concentración de propionato (Grant *et al.*, 1990; Fahey *et al.*, 1993).

Los cambios en el pH y/o en la tasa de dilución también afectaron a la producción y concentración de AGV. Las variaciones debidas al pH fueron de mayor magnitud que las debidas a los cambios en la tasa de dilución de sólidos (Exp. 3, Capítulo 4, Tabla 2), lo cual coincide con las observaciones de otros autores quienes afirman que variaciones en la tasa de dilución de sólidos por sí sola (Hoover *et al.*, 1982), o de la tasa de dilución de sólidos y líquidos simultáneamente (Shriver *et al.*, 1986) afectan poco a la producción total o al perfil de AGV. No obstante, los resultados observados en el presente experimento cuando la tasa de dilución de sólidos se redujo de 10 a 4%/h resultó en un incremento ( $P < 0.10$ ) del 10% en la producción total de AGV y de 6.7% en la relación acetato:propionato ( $P < 0.05$ ), sugiriendo que el aumento en el tiempo de retención de las partículas en el fermentador permitió una mayor degradación de los carbohidratos por parte de los microorganismos. Esta mayor actividad

degradativa se correspondió con una mayor digestión de la MO y de la fibra. La mayor degradación de la fibra ( $P < 0.01$ ) observada con la tasa de dilución lenta comparado con la tasa de dilución rápida se relacionó con un incremento numérico en la cantidad de acetato producido, que explica el incremento en la relación acetato: propionato.

La producción de AGV está en función del crecimiento microbiano, y se ha demostrado que, en condiciones de pH bajo, se inhibe el crecimiento de un gran número de especies bacterianas, especialmente las celulolíticas (Shriver *et al.*, 1986; Russell, 1998b), lo cual explicaría la menor producción de AGV a pH 5.5 comparado con el pH 6.5. Por otro lado, el patrón de fermentación está determinado por la composición de la población microbiana, y ésta, a su vez, depende del tipo de carbohidratos aportado en la dieta (France y Siddons, 1993). Dado lo difícil que resulta separar *in vivo* los efectos del tipo de sustrato y el pH del medio, los experimentos *in vitro* constituyen una herramienta muy valiosa que permite el estudio de ambos factores de forma aislada. Así por ejemplo, Russell (1998b) desarrolló un modelo donde comparó el efecto del pH y el tipo de sustrato de fermentación en los cambios observados en la relación acetato:propionato. Los resultados obtenidos le permitieron concluir que la dieta tuvo un impacto mayor en los cambios observados en la relación acetato:propionato, y que el efecto del pH permitió explicar sólo un 25% de los cambios observados en dicha relación.

Sin embargo, si se analizan de forma conjunta los resultados observados en los Exp. 2 y 3, donde se evaluaron el efecto del tipo de dieta (Exp. 2) y el pH de fermentación (Exp. 3), y se valoran las diferencias observadas en la concentración de los principales AGV (Figura 2) y en la relación acetato:propionato (Figura 3) entre los dos tratamientos considerados, puede deducirse que el hecho de mantener el pH de fermentación a 5.5 en vez de a pH 6.5 produjo una reducción del 10% en la proporción molar de acetato, un incremento de 51% en la proporción molar de propionato y una reducción del 41% en la relación acetato:propionato. Por el contrario, al variar la relación forraje:concentrado de 67:33 (dieta HF) a 39:61 (dieta LF), se observó una



reducción del 8% en la proporción molar de acetato, un incremento de 17% en la proporción de propionato y una reducción del 18% en la relación acetato:propionato. A pesar de que en nuestro caso los niveles de inclusión de forraje y concentrado fueron diferentes a los utilizados por Russell (1998b), quien comparó los inóculos obtenidos de vacas que consumían 100% forraje o una relación forraje:concentrado de 10:90, los resultados indican que fue el pH del medio, y no el tipo de dieta, el factor que mayor impacto tuvo en los cambios observados en la producción y perfil de los AGV.

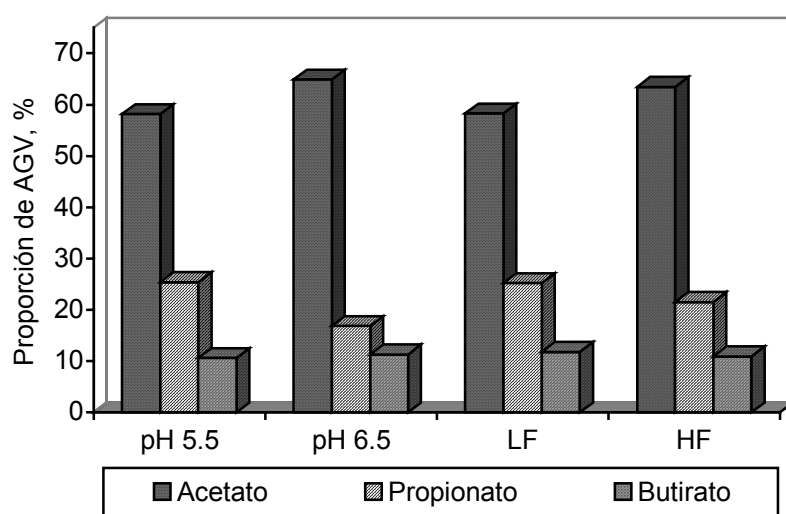


Figura 2. Efecto del pH y del tipo de dieta en la proporción molar de AGV

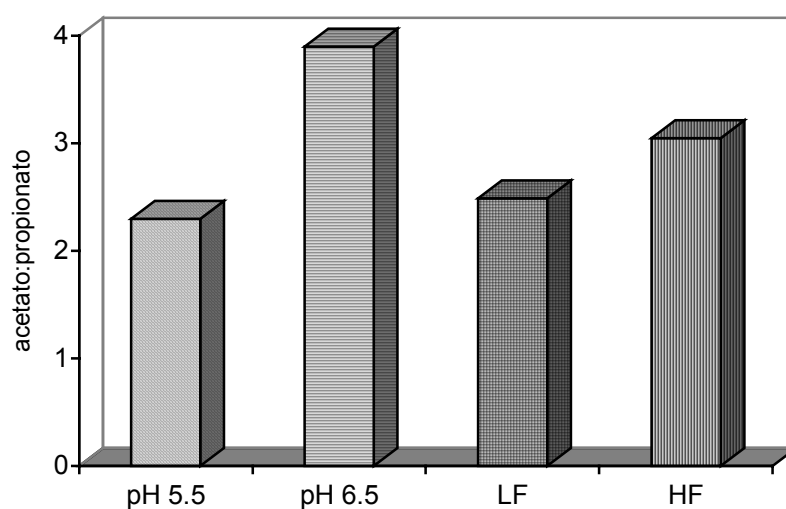


Figura 3. Efecto del pH y del tipo de dieta en la relación acetato:propionato

### **Metabolismo del Nitrógeno**

*Concentración y Flujo de Nitrógeno Amoniacal y No Amoniacal.* La concentración de amoníaco en el rumen es un índice de referencia de la disponibilidad de N para la síntesis de proteína microbiana (Wallace y Cotta, 1988; Mackie y White, 1990; Nolan, 1993). Sin embargo, su interpretación es compleja, ya que su concentración es el resultado de producción y utilización o paso del amoníaco en el rumen (Nolan, 1993). Los resultados observados en cada uno de los experimentos permiten señalar que el rango de valores para la concentración de amoníaco varía entre 8.8 y 18.6 mg/100 mL, dependiendo de los factores principales evaluados. En ningún caso este valor fue inferior a los 5 mg/100 mL señalado como la concentración mínima requerida para maximizar la síntesis de proteína microbiana en experimentos *in vitro* (Satter y Slyter, 1974; Russell y Strobel, 1987).

La concentración de N amoniacal varió con el contenido de proteína bruta en la dieta y la inclusión del aditivo Regepro<sup>®</sup> (Exp. 1, Tabla 4), así como con el pH de fermentación (Exp. 3, Tabla 3). Un menor contenido de proteína bruta en la dieta (19.3 vs 17.5%, Exp. 1) se correspondió con una reducción del 22% en la concentración y flujo de N amoniacal, sin que se observaran diferencias importantes en el flujo de N no amoniacal o en la degradación de la proteína. Por otra parte, la inclusión del aditivo Regepro<sup>®</sup> resultó en una reducción dosis-dependiente en la concentración de amoníaco, observándose una reducción máxima del 18% cuando la dosis de Regepro<sup>®</sup> fue de 0.3 g/100 g MS respecto al tratamiento control. Al igual que con el tipo de dieta, la disminución en la concentración de amoníaco no afectó de manera significativa al resto de parámetros del metabolismo proteico.

No obstante, el factor que tuvo mayor impacto negativo en la concentración de N amoniacal fue la reducción del pH de fermentación, observándose un descenso del 45% cuando el pH se redujo de 6.5 a 5.5. La reducción en la concentración de N amoniacal en condiciones de pH bajo es un efecto comúnmente observado en experimentos *in vivo* e *in vitro* (Lana *et al.*, 1998;

Calsamiglia *et al.*, 2002). Una baja concentración de amoníaco puede ocurrir como consecuencia de una menor degradación de la proteína, por una reducida actividad desaminativa (Erfle *et al.*, 1982) o también porque una mayor cantidad de N amoniacal puede ser utilizada para la síntesis de proteína microbiana (Lana *et al.*, 1998). En nuestro caso, el descenso en la concentración de N amoniacal observada a pH 5.5 se debió probablemente a una menor degradación proteica, ya que la menor concentración de amoníaco se correspondió con una menor digestión de la fibra (Exp. 3, Tabla 1), explicado por el impacto negativo que el pH bajo ejerce en el crecimiento la población celulolítica (Hoover, 1986; Russell y Wilson, 1996). Al disminuir la digestión de la fibra, se restringe el acceso de las bacterias proteolíticas a la proteína unida a la fibra y, por lo tanto, a su degradación (Ørskov, 1988; Broderick *et al.*, 1991).

*Síntesis y Eficiencia de Síntesis de Proteína Microbiana.* La síntesis (g/d) y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESPM, g N bacteriano/kg MORD) se estimaron mediante el uso de las bases púricas como marcador microbiano, y con muestras de bacterias obtenidas de las fracciones líquida (BL) y sólida (BS) del fermentador. El rango de valores medios para la síntesis de proteína microbiana (g N microbiano/d) varió, según los distintos factores principales considerados, entre 0.96 y 1.53 g/d cuando se utilizó BL y entre 1.02 y 1.52 g/d cuando se utilizó BS en los cálculos. El aporte medio de proteína microbiana respecto al flujo total de N no amoniacal fue del 51.0% cuando se utilizó BL (rango 39.7 y 65.8%) y del 52.6% cuando se utilizó BS en los cálculos (rango 42.0 y 67.1%), respectivamente. Estos porcentajes fueron inferiores al 59% señalado por Clark *et al.* (1992) como valor medio obtenido de datos bibliográficos en el vacuno lechero *in vivo*. Por otra parte, el valor medio de todos los experimentos para la eficiencia de síntesis de proteína microbiana fue de 31.1 g N/kgMORD cuando se utilizó BL (rango 19.4 – 46.7) y de 31.4 g N/kgMORD cuando se utilizó BS en los cálculos (rango 26.8 – 40.2). La amplitud del rango de valores confirma la variabilidad de este parámetro (Stern y Hoover, 1979; Stokes *et al.*, 1991), y cuestiona el uso de un valor constante de ESPM

por parte de la mayoría de los sistemas de racionamiento para el vacuno lechero (AFRC, 1993; INRA, 1988; NRC, 2001).

Cuando se evaluó el efecto de los distintos factores principales en la síntesis de proteína microbiana, se pudo constatar que la disminución del tamaño de partículas del forraje ( $\geq 3$  mm vs  $\leq 1$ mm; Exp. 2, Tabla 4) o el incremento en la tasa de dilución de sólidos (de 4 a 10%/h; Exp. 3, Tabla 3) se relacionaron con una mayor síntesis de proteína microbiana. El efecto positivo de la reducción del tamaño de partículas puede estar relacionado con el incremento en la superficie expuesta para el ataque microbiano (Bowman y Firkins, 1993), con lo cual hay un aumento de la disponibilidad de energía que favorece el crecimiento microbiano. La mayor síntesis de proteína microbiana observada con una mayor tasa de dilución de sólidos se atribuye a la selección de especies microbianas de rápido crecimiento (Crawford *et al.*, 1980) y/o a la reducción en las necesidades de mantenimiento debido a un menor reciclaje de la proteína microbiana sintetizada (Dijkstra *et al.*, 1998).

Un aspecto que merece la pena resaltar fueron las diferencias en cuanto a la magnitud del efecto o la interpretación de los resultados según el tipo de población bacteriana considerada en los cálculos. Así, por ejemplo, las diferencias observadas en la síntesis de proteína microbiana con la variación del tamaño de partículas del forraje fueron significativas sólo cuando BL en vez de BS se utilizaron en los cálculos. Mientras que las diferencias debidas a los cambios en la tasa de dilución de sólidos, aunque se observaron con ambas poblaciones, la magnitud de la diferencia fue mayor con BS que con BL. Dicho efecto podría explicarse por un mayor error estándar de dichas estimaciones, ya que tanto la diferencia numérica como la tendencia observada fueron similares entre tratamientos.

Por su parte, la ESPM fue distinta en función del nivel de fibra y el tamaño de sus partículas (Exp.2; Tabla 4), así como el pH y la tasa de dilución de sólidos (Exp. 3; Tabla 3). Los mayores valores de ESPM correspondieron al nivel alto de fibra en la dieta (67 vs 39% heno de alfalfa), el tamaño de partículas pequeño ( $\leq 1$ mm vs  $\geq 3$ mm), el pH de fermentación bajo (5.5 vs 6.5) y la tasa de dilución de

sólidos rápida (4 vs 10%/h). La mayor ESPM observada con dietas a base de forrajes coincide con las observaciones de experimentos *in vivo* (Rode *et al.*, 1985; Demeyer y Van Nevel, 1986; Archimede *et al.*, 1997), y se atribuye a las menores necesidades de mantenimiento de las bacterias que fermentan carbohidratos estructurales comparado con las que fermentan carbohidratos no estructurales (Russell *et al.*, 1992). Las razones que explican la mayor ESPM con el menor tamaño de partículas y mayor tasa de dilución de sólidos son las mismas que explican el incremento en la síntesis de proteína microbiana, y que fueron expuestas anteriormente. Además, el aumento en la ESPM observada a pH bajo se debió a la reducción de la cantidad de MORD y no al aumento en la síntesis de proteína microbiana.

De forma similar a lo observado con la síntesis de proteína microbiana, las diferencias o la magnitud del efecto de los distintos factores principales considerados sobre la ESPM fueron, en la mayoría de los casos, dependientes de la población bacteriana utilizada como referencia en los cálculos. Este hecho destaca la importancia de la representatividad de las muestras de bacterias que se utilizan como referencia en la estimación de la síntesis y la ESPM.

Además de evaluar el efecto de los distintos factores principales considerados, se intentó establecer algún tipo de asociación entre variables que pudieran explicar las diferencias observadas en la cantidad de proteína microbiana sintetizada mediante análisis de correlación ( $r$ ) y de regresión simple ( $r^2$ ). Dado que la síntesis de proteína microbiana depende, fundamentalmente, de la disponibilidad de energía y de N para el crecimiento de los microorganismos (Hoover y Stokes, 1991; Clark *et al.*, 1992), las variables seleccionadas fueron la concentración de N amoniacal (como índice de disponibilidad de N, Figura 4) y la cantidad de MORD (como índice de disponibilidad de energía, Figura 5).

Cuando se analizaron de forma conjunta los datos de los 3 experimentos ( $n=56$ ), donde la concentración de amoníaco varió entre 3.6 y 24.1 mg/100 mL, se observó una relación negativa entre la concentración de N amoniacal y la cantidad de proteína microbiana sintetizada, aunque el grado de asociación

entre variables difirió con el tipo de población microbiana utilizada en los cálculos (BL:  $r = -0.53$ ,  $r^2 = 0.28$ ; BS:  $r = -0.42$ ,  $r^2 = 0.18$ , Figura 4). Se observó una tendencia similar cuando se analizó cada uno de los experimentos por separado (datos no mostrados). Estos resultados permiten concluir que un incremento en la concentración de N amoniacal no se relaciona necesariamente con un incremento en la síntesis de proteína microbiana. Es posible que si la concentración de N amoniacal es superior al valor mínimo limitante de 2 – 5 mg/dL (Satter y Slyter, 1974), otros factores nutritivos son más determinantes para la síntesis de proteína microbiana. La concentración de amoniaco como parámetro único quizás no describa adecuadamente el aporte de precursores para la síntesis de proteína microbiana, sobretodo si consideramos que los microorganismos pueden utilizar otras fuentes de N como son los AA y péptidos (Cotta y Russell, 1982; Broderick *et al.*, 1991) para sintetizar proteína microbiana. De hecho, Hoover y Stokes (1991), en su artículo de revisión concluyeron que tanto la síntesis como la ESPM se incrementan en respuesta al aumento en la cantidad de proteína degradable. Se estima que entre un 20 y un 40% de la proteína que se degrada en el rumen es utilizada en forma de péptidos y AA libres por los microorganismos (Baldwin y Allison, 1983).

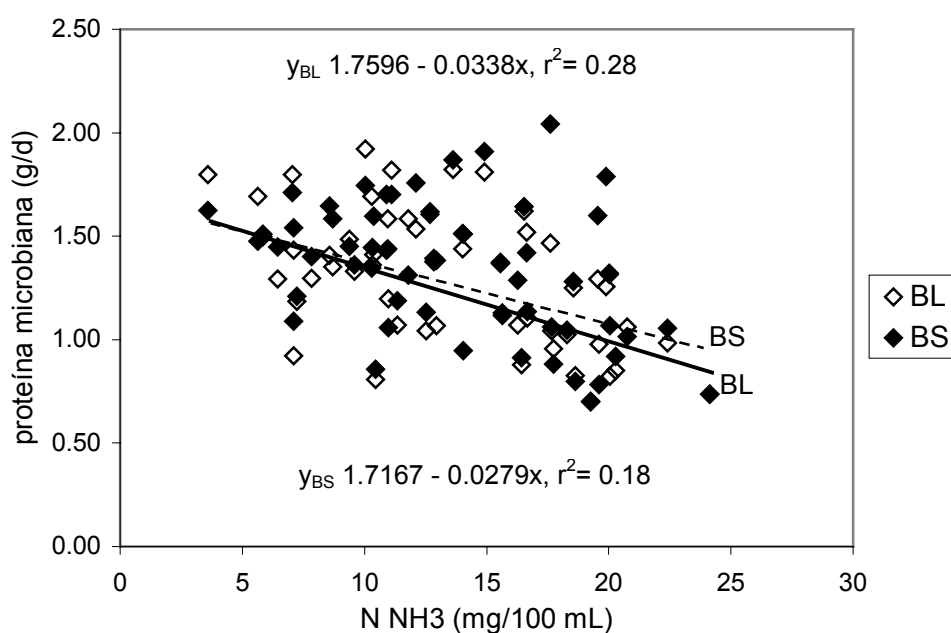


Figura 4. Relación entre la concentración de N amoniacal y la síntesis de proteína microbiana

Clark *et al.* (1992) afirmaron que si la concentración de amoníaco excede de los 2 – 5 mg/100 mL, el flujo de N microbiano se correlaciona más con la cantidad de MORD que con la concentración de amoníaco en el líquido ruminal. Sin embargo, los datos aquí presentados no permiten confirmar esta observación (Figura 5), ya que la MORD tuvo un coeficiente de correlación con la síntesis de proteína microbiana inferior que con la concentración de N amoniacal. Los resultados solo permiten indicar la existencia de una relación positiva entre la MORD y la síntesis de proteína microbiana, ya que la correlación fue significativa al utilizar BL ( $P = 0.021$ ) y se observó una tendencia cuando se utilizó BS ( $P = 0.09$ ). Sin embargo, al igual que para la concentración de amoníaco, el grado de asociación entre variables difirió con el tipo de población bacteriana considerada, obteniéndose un mejor ajuste cuando se utilizó BL ( $r^2 = 0.18$ ) comparado con BS ( $r^2 = 0.05$ ) como fracción bacteriana de referencia en los cálculos.

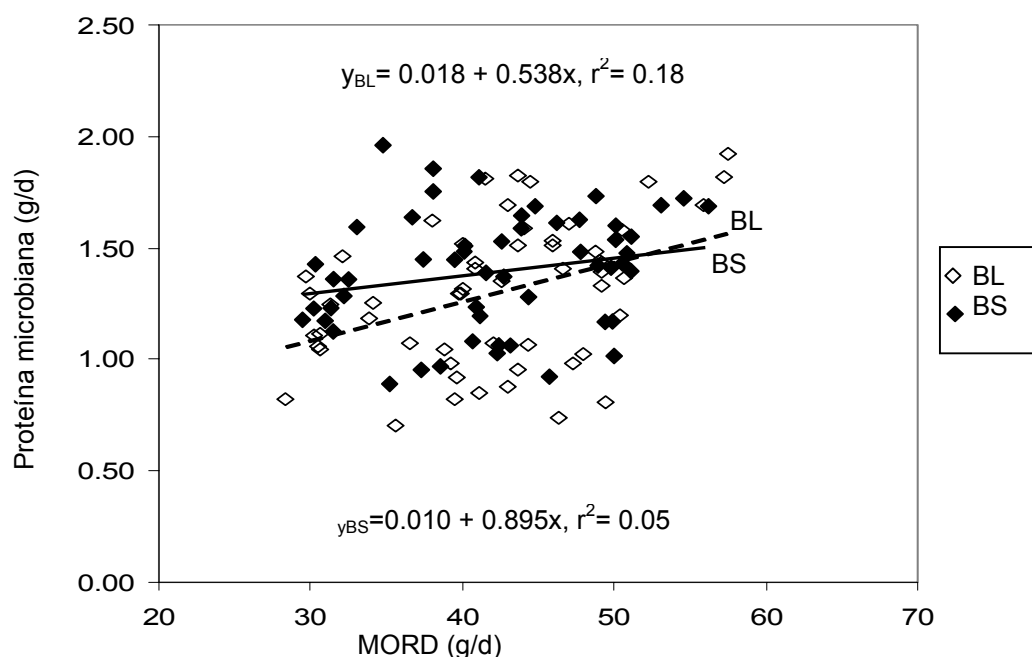


Figura 5. Relación entre la cantidad de MORD y la síntesis de proteína microbiana

Dado que con ninguna de las dos variables se obtuvo un adecuado ajuste de la regresión, se decidió incluir otras variables relacionadas con el aporte de

energía o de N en el análisis. Para ello, se seleccionaron la cantidad de proteína degradada en rumen (g/d) y de fibra (gFND/d) como variables de predicción (Figuras 6 y 7). Como puede observarse, la mejor predicción de la síntesis de proteína microbiana se obtuvo cuando se utilizó la proteína degradable y no la concentración de N amoniacal, como variable de predicción independiente. En este caso se observó una menor dispersión de los datos a lo largo de la recta de regresión. Sin embargo, y al igual que con las variables anteriores, el grado de asociación varió según el tipo de población bacteriana utilizada en los cálculos. En este caso el mejor ajuste se obtuvo cuando se utilizó BS ( $r^2=0.72$ ) en vez de BL ( $r^2=0.66$ ) como población bacteriana de referencia.

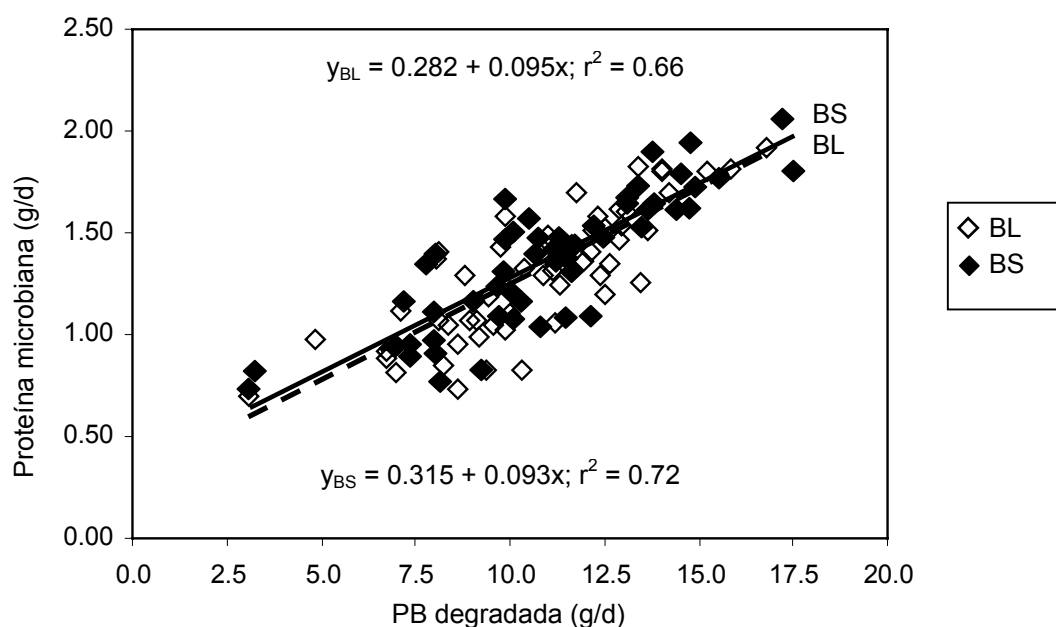


Figura 6. Relación entre la cantidad de proteína bruta degradada y la síntesis de proteína microbiana

Esta observación sugiere que los péptidos y AA, además del amoníaco cumplen un papel importante en la síntesis de proteína microbiana, y coincide con las observaciones de otros experimentos donde se indica que los AA y especialmente los péptidos son estimulantes del crecimiento de los microorganismos cuando se utilizan fuentes de energía de fermentación rápida y en grandes cantidades (Cotta y Russell, 1982; Argyle y Baldwin, 1989; Cruz-Soto *et al.*, 1994; Russell, 1998a). De hecho, el aporte de péptidos y AA es tomado en



cuenta por el CNCPS (Russell *et al.*, 1992), al considerar que las bacterias que fermentan carbohidratos no estructurales pueden utilizar hasta un 66% del N en forma de péptidos y AA cuando hay disponibilidad de éstos en el medio.

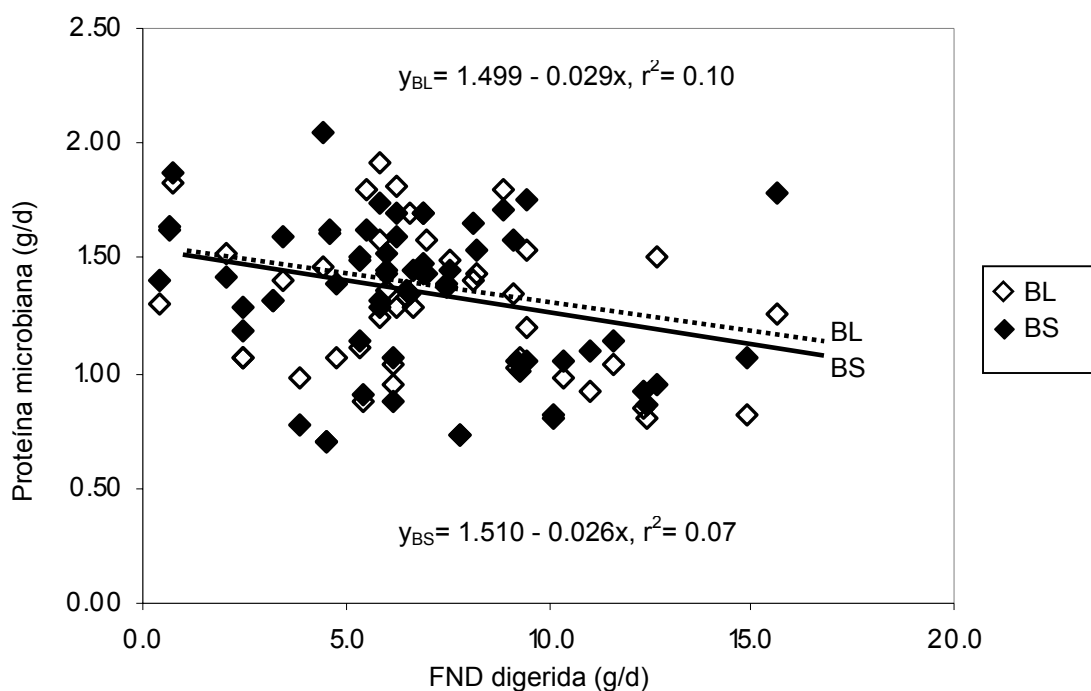


Figura 7. Relación entre la cantidad de FND digerida y la síntesis de proteína microbiana

La digestión de la fibra también proporcionó información interesante, ya que contrario a lo esperado, se observó una relación negativa con la síntesis de proteína microbiana. A pesar de resultar significativa en el modelo de regresión, los coeficientes de regresión y determinación fueron también bajos (Figura 7). Es importante señalar que los valores de digestibilidad de la fibra fueron los que presentaron mayores desviaciones en relación con los valores observados en otros experimentos similares realizados en cultivo continuo (Hoover *et al.*, 1982, 1984; Calsamiglia *et al.*, 2002). En el Exp. 3, cuando se consideraron valores extremos de pH (pH 5.5) y tasa de dilución rápida (10%/h) se observaron valores negativos para la digestión de la FND, los cuales fueron excluidos del análisis por no tener sentido biológico. Contrario a lo esperado para esta variable, el

grado de asociación con otras variables fue mayor cuando BL ( $r^2 = 0.10$ ) en vez de BS ( $r^2 = 0.07$ ) se utilizó como población bacteriana de referencia.

Finalmente se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, tomando en cuenta las cuatro variables antes indicadas. Para ello se realizó un análisis de regresión paso a paso, utilizando el procedimiento STEPWISE del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, 1988), cuyos resultados se presentan en la Tabla 1. Pese al pequeño número de observaciones utilizadas para generar dichas ecuaciones, lo que limita su generalización, las ecuaciones resultan de gran interés práctico.

Tabla 1. Relación entre algunas variables y la estimación de la síntesis de proteína microbiana (g/d) utilizando BL y BS como referencia

Variables independientes <sup>e</sup>	Intercepto <sup>f</sup>	Coeficientes de regresión <sup>g</sup>				$r^2$
	a	b	c	d		
BL						
PBD	0.244 *	0.097 ***				0.676
PBD N NH3	0.678 ***	0.084 ***	-0.022 ***			0.782
PBD N NH3 FNDD	0.819 ***	0.083 ***	-0.020 ***	-0.020 ***		0.829
BS						
PBD	0.285 ***	0.095 ***				0.730
PBD N NH3	0.610 ***	0.088 ***	-0.018 ***			0.804
PBD N NH3 FNDD	0.728 ***	0.087 ***	-0.017 ***	-0.018 ***		0.839

<sup>e</sup>: PBD= cantidad de PB degradable; N NH3 = concentración de N amoniacal; FNDD = cantidad de FND digerido.

<sup>f</sup>: \*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

<sup>g</sup>:  $y = a + bx + cy + dz$ .

Como se indicó anteriormente, la degradación de la proteína constituyó el mejor estimador lineal simple de la síntesis de proteína microbiana. Al incluir además la concentración de N amoniacal como variable de predicción produjo un incremento notable del coeficiente de regresión. En el análisis de regresión lineal múltiple, la variable MORD no entró en el modelo, ya que no alcanzó el nivel mínimo de significación exigido por el modelo de regresión (establecido en 0.15). La digestión de la fibra sí fue incorporada en el modelo de predicción, pero la mejora obtenida en el coeficiente de regresión con su inclusión fue de menor magnitud si se compara con la mejora observada con la inclusión de la concentración de N amoniacal como variable de predicción (Tabla 1).

#### **4. Perfil y flujo de aminoácidos de origen microbiano.**

La proteína microbiana sintetizada en el rumen representa una proporción importante de los AA absorbibles que llegan al intestino delgado y son, además, de alto valor biológico para el rumiante (Stern *et al.*, 1994; Hoover y Miller, 1996). En dietas convencionales, la proteína microbiana proporciona entre el 40 y el 90% de los AA que fluyen al intestino delgado (Russell *et al.*, 1992). Por ello, los sistemas actuales de formulación proteica para el vacuno lechero incluyen los aportes de proteína en términos de aminoácidos microbianos en sus modelos de predicción (O'Connor *et al.*, 1993; Rulquin y Vérité, 1993; Lescoat y Sauvant, 1995; NRC, 2001). Sin embargo, en la mayoría de ellos se asume que el perfil de AA de las bacterias es constante (O'Connor *et al.*, 1993; Rulquin y Vérité, 1993; Lescoat y Sauvant, 1995).

A partir de los datos publicados por Clark *et al.* (1992) se originó una polémica sobre la validez de asumir que el perfil de AA de la proteína microbiana es constante, sobre todo porque datos posteriores han corroborado no sólo la existencia de dicha variación, sino que además han permitido detectar diferencias importantes en el perfil de AA entre BL y BS (Lallès *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001b). A pesar de ello, la mayoría de sistemas de formulación proteica que incluyen el concepto de AA

disponibles como criterio de formulación no consideran la posibilidad de que el perfil de AA difiera entre BL y BS. Así, por ejemplo, en el Sistema Francés (Rulquin y Vérité, 1993; Rulquin *et al.*, 1998) para valorar el aporte de AA provenientes de la proteína microbiana se utiliza el perfil de AA de las bacterias aisladas de la fracción líquida, el cual proviene de datos bibliográficos (promedio de 66 publicaciones). Por su parte en el CNCPS (O'Connor *et al.*, 1993), donde también se discrimina el aporte de AA de origen microbiano, se utiliza igualmente el perfil de AA de las bacterias asociadas con la fracción líquida. Aunque en este caso la composición puede variar según el perfil y la digestibilidad intestinal de los AA provenientes de la pared celular y del citoplasma microbiano. En consecuencia, el uso del perfil de AA de las bacterias aisladas de la fracción líquida del rumen como una muestra representativa del total de la materia microbiana es muy cuestionable.

Dicho planteamiento constituyó uno de los principales argumentos para la formulación de los objetivos de este trabajo. El mismo se basó en la premisa que al modificar ciertos factores capaces de provocar cambios en la contribución parcial de las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida del contenido ruminal (BL y BS) pueden alterar el perfil y/o el flujo de AA de origen microbiano que fluyen al tracto digestivo inferior. Entre ellos se incluyen el nivel de fibra y el tamaño de sus partículas (por sus efectos sobre la población adherida a la fracción sólida) o los cambios en las condiciones de fermentación (pH y/o la tasa de dilución), por sus efectos sobre el crecimiento microbiano.

Tomando en cuenta los resultados de los experimentos aquí descritos se puede afirmar que el perfil de AAE difirió poco entre BL y BS. Aunque el perfil de ciertos AA difirió cuando se utilizó BS o BL como población de referencia en los cálculos, dichas diferencias fueron biológicamente poco importantes (Tabla 2 de este capítulo). Si se consideran además los valores absolutos del perfil de AAE y se comparan con los datos bibliográficos, podemos señalar que aunque no siempre estuvieron dentro del rango de valores, el perfil de AAE de las bacterias resultó bastante similar al mismo. Además, se puede observar que, a pesar de lo limitado de los datos disponibles, el contenido en AAE de BL y BS se encuentra

en un rango bastante estrecho. Cuando se comparó con el rango de valores publicado por Clark *et al.* (1992), datos provenientes en su mayoría de aislados bacterianos obtenidos de la fracción líquida, la desviación fue aún de menor magnitud. Quizás fueron relevantes los valores excepcionalmente altos para el contenido de Lys observado en nuestros experimentos, cuando se comparó con el perfil de AAE de bacterias obtenidas de la fracción líquida (Clark *et al.*, 1992) o de ambas fracciones (Lallès *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001b).

Tabla 2. Perfil de AA esenciales (% del total de AA) en bacterias asociadas a las fracciones líquida y sólida de la digesta. Datos bibliográficos y experimentales

GB <sup>a</sup>	Aminoácidos Esenciales								
	Thr	Arg	Val	Met	Ile	Leu	Phe	Lys	His
BL, Exp. 2	6.17	3.51 <sup>e</sup>	5.63	1.25	4.81	6.26	3.50	12.06 <sup>c</sup>	2.53 <sup>g</sup>
BS, Exp. 2	6.10	3.62 <sup>d</sup>	5.53	1.22	4.65	6.17	3.49	11.34 <sup>d</sup>	2.61 <sup>f</sup>
BL, Exp. 3	5.99 <sup>g</sup>	3.48	5.06	1.30	4.08	5.87	3.32 <sup>e</sup>	11.24	2.87 <sup>e</sup>
BS, Exp. 3	5.90 <sup>f</sup>	3.51	5.07	1.26	4.02	6.01	3.43 <sup>d</sup>	10.94	2.97 <sup>d</sup>
Media <sup>b</sup> BL	5.96	4.51	6.43	2.59	5.93	7.94	4.91	7.13	1.53
BS	5.97	4.43	6.42	2.51	5.87	7.89	4.88	7.23	1.50
Rango <sup>c</sup> BL	5.7-6.6	2.8-5.2	6.4-7.3	2.1-3.2	5.5-6.4	7.4-8.3	3.2-5.2	6.0-9.1	1.0-1.7
BS	5.4-6.3	3.5-5.4	5.6-6.8	1.4-3.6	5.3-6.5	7.6-8.5	3.8-5.7	5.8-8.5	1.4-1.9

<sup>a</sup> Bacterias asociadas con las fracciones líquida (BL) y sólida (BS), datos experimentales (Exp. 2 y 3) y bibliográficos.

<sup>b,c</sup> Valor medio y rango del valores para el perfil de AA de las bacterias, calculado a partir de los datos de Lallès *et al.* (1992); Martin *et al.* (1996); Rodríguez *et al.* (2000); Yang *et al.* (2001b).

<sup>d,e</sup> letras distintas en una misma columna indican diferencias en el perfil de AA entre BL y BS (P < 0.05).

<sup>f,g</sup>, letras distintas en una misma columna indican diferencias en el perfil de AA entre BL y BS (P < 0.10).

Cuando se utilizó BL o BS para estimar el flujo de AA de origen microbiano se observaron diferencias importantes entre ambos grupos bacterianos, pero sólo en el Exp. 2 (Tabla 5, Capítulo 3), en cuyo caso el flujo estimado de AA de origen microbiano fue mayor en 14 de los 16 AA evaluados y en 7 de los 9 AA esenciales (AAE, excepto Met,  $P < 0.10$  y Lys  $P > 0.10$ ) cuando BS en vez de BL se utilizaron en los cálculos. En el Exp. 3 no se observaron diferencias en el flujo estimado de AAE de origen microbiano cuando BL o BS se utilizaron en los cálculos. Es decir, si se analizan de forma conjunta los resultados de ambos experimentos respecto a las diferencias observadas en el flujo de AA entre BL y BS, los resultados parecen contradictorios. No obstante, la inconsistencia en las diferencias observadas entre experimentos es una evidencia de la falta de datos bibliográficos que permitan estimar de forma precisa el flujo de aminoácidos de origen microbiano de BL y BS. Esta información es necesaria para poder incluirla en los modelos de predicción que utilizan los actuales sistemas de racionamiento para el vacuno lechero. Además, confirman las recomendaciones hechas por Martin *et al.* (1996), quienes indicaron la necesidad de mejorar la exactitud al medir la contribución total y parcial de cada fracción al flujo total de AA de origen microbiano al intestino delgado del rumiante.

La inconsistencia entre los resultados de los dos experimentos al calcular el flujo de AA de origen bacteriano parece estar relacionada con las diferencias entre ambos grupos bacterianos en la relación BP:N, necesario para estimar la cantidad de proteína microbiana sintetizada. Es decir, indica que la estimación del flujo de materia seca microbiana (dependiente de la relación N:purinas) tuvo un impacto mayor en la estimación del flujo de AA de origen bacteriano que las diferencias en el perfil de AA. En el Exp. 2, la relación BP:N fue numéricamente mayor en BL comparado con BS (22.28 vs 21.55) y prácticamente idénticas en el Exp. 3 (21.7 vs 21.9 para BL y BS, respectivamente). Estos datos sugieren que la estimación de la síntesis de la proteína microbiana en el rumen y los factores que lo afectan, así como la contribución relativa de cada población microbiana (BL y BS) al flujo total de proteína microbiana, son esenciales para mejorar la precisión al estimar el flujo de AA de origen microbiano al intestino delgado.

Tabla 3. Resumen comparativo del efecto de los factores principales en el perfil y flujo de AA esenciales de las bacterias

AA	GB <sup>a</sup>	Perfil de AA (g/100 g AA) <sup>b</sup>				Flujo de AA (g/d) <sup>c</sup>			
		NF	TP	pH	TD	NF	TP	pH	TD
Thr	BL	NS	NS	***	NS	NS	NS	NS	†
	BS	NS	*	***	NS	†	NS	NS	NS
Arg	BL	†	NS	**	NS	†	NS	NS	*
	BS	†	NS	***	*	*	NS	NS	†
Val	BL	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
	BS	NS	NS	NS	*	†	NS	NS	†
Met	BL	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
	BS	NS	NS	NS	NS	†	NS	NS	*
Ile	BL	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	*
	BS	*	†	NS	***	*	NS	NS	*
Leu	BL	NS	†	NS	NS	NS	NS	NS	*
	BS	NS	NS	NS	**	†	NS	NS	†
Phe	BL	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
	BS	NS	NS	NS	NS	†	NS	NS	NS
Lys	BL	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
	BS	NS	*	NS	†	†	NS	NS	*
His	BL	NS	NS	***	NS	†	NS	NS	*
	BS	NS	NS	***	*	*	NS	NS	†

<sup>a</sup> GB = Grupo bacteriano, considerando BL o BS en el cálculo

<sup>b</sup> Efecto de los factores principales en el perfil de AA bacteriano: NF = nivel de fibra; TP = tamaño de partículas; pH; TD = tasa de dilución de sólidos; NS = no significativo; † =  $P < 0.10$ ; \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$ .

<sup>c</sup> Efecto de los factores principales en el flujo de AA bacteriano: NF = nivel de fibra; TP = tamaño de partículas; pH; TD = tasa de dilución de sólidos; NS = no significativo; † =  $P < 0.10$ ; \* =  $P < 0.05$ .

Además de las diferencias entre poblaciones bacterianas, se analizó también el efecto de los diferentes factores relacionados con la dieta (nivel de fibra y tamaño de partícula) y con el medio ruminal (pH y tasa de dilución) en el perfil y flujo de AAE (Tabla 3 de este capítulo). Si analizamos los resultados

presentados en dicha tabla podemos observar que, aunque se observaron diferencias en el perfil de AA, fue en el flujo estimado de AA donde se observaron las mayores diferencias relacionadas con variaciones en los factores principales considerados. Sin embargo, una vez más la interpretación de los resultados o la magnitud del efecto fue dependiente del tipo de población bacteriana considerada.

En líneas generales, y tomando en cuenta los datos obtenidos en los Exp. 2 y 3, se puede concluir que el perfil de AA de la proteína microbiana varió poco según los factores principales considerados, porque las diferencias observadas fueron biológicamente poco importantes (Tabla 7, Exp. 2; Tabla 6, Exp. 3). Sin embargo, las diferencias en el flujo de AA de origen microbiano utilizando BL o BS fueron, en la mayoría de los casos, estadística y biológicamente relevantes (Tabla 9, Exp. 2; Tabla 8, Exp. 3).

El flujo de todos los AAE de las bacterias difirió con el nivel de fibra y la tasa de dilución de sólidos, siendo el efecto más evidente cuando se utilizó en los cálculos BS en vez de BL. El flujo de AAE de origen bacteriano fue mayor en dietas con alto nivel de fibra en la dieta y cuando se utilizó una mayor tasa de dilución de sólidos. El hecho de observar diferencias en el flujo estimado de AA de origen bacteriano debidas a cambios en la dieta o el medio ruminal cuestiona la no inclusión de dichos efectos como factores condicionantes en los modelos de predicción que utilizan los sistemas de formulación de rumiantes basados en las necesidades y aportes de AA al intestino delgado.

## **5. Referencias Bibliográficas**

- Agricultural and Food Research Council (AFRC). 1993. Energy and Protein Requirements of Ruminants. CAB International. Wallingford, UK.
- Archimède, H., D. Sauvant, and P. Schmidely. 1997. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. *Reprod. Nutr. Dev.* 37:173-189.



- Argyle, J. L., and R. L. Baldwin. 1989. Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields. *J. Dairy Sci.* 72:2017-2027.
- Baldwin, R. L., and J. L. Argyle. 1988. Modeling Metabolism. Pages 286-298 in *Aspects of Digestive Physiology*. Dobson and Dobson (eds). Comstock Publ. Ass. Ithaca, NY.
- Baldwin, R. L., and M. J. Allison. 1983. Rumen metabolism. *J. Anim. Sci.* 57:461-477. Suppl. 2.
- Barry, T. N. 1976. The effectiveness of formaldehyde treatment in protecting dietary protein from rumen microbial degradation. *Proc. Nutr. Soc.* 35:221.
- Bauchemin, K. A., B. I. Farr, L. M. Rode, and G. B. Shaalje. 1994. Effects of alfalfa silage chop length and supplementary long hay on chewing and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:1326-1339.
- Bernard, J. K., J. W. West, and D. S. Trammel. 2002. Effect of replacing corn silage with annual ryegrass silage on nutrient digestibility, intake, and milk yield for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2277-2282.
- Bourquin, L. D., E. C. Titgemeyer, J. Van Milgen, and G. C. Fahey. 1994. Forage level and particle size effects on orchardgrass steers: II. Ruminal digestion kinetics of cell wall components. *J. Anim. Sci.* 72:759-767.
- Bowman, J. G. P., and J. L. Firkins. 1993. Effects of forage species and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization in situ. *J. Anim. Sci.* 71:1623-1633.
- Broderick, G. A., and N. R. Merchen. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy Sci.* 75:2618-2632.
- Broderick, G. A., R. J. Wallace, and E. Ørskov. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. Pages 541-592 in *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima (eds). Academic Press, Orlando, FL, USA.

- Calsamiglia, S., A. Ferret and M. Devant. 2002. Effect of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:574-579.
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. C. Gay, and L. L. Berger. 1990. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency and isolation techniques. *J. Dairy Sci.* 73:2480-2488.
- Cheng, K. J., J. Fay, and R. Howarth. 1980. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:613-619.
- Clark, J. H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 75:2304-2323.
- Cotta, M. A., and J. B. Russell, 1982. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 65:226-234.
- Crawford, R. J., W. H. Hoover, and P. H. Knowlton. 1980. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. I. Dry matter and fiber digestion, VFA production and protozoa number. *J. Anim. Sci.* 51:986-995.
- Cruz-Soto, R., S. A. Muhammad, C. J. Newbold, C. S. Steward, and R. J. Wallace. 1994. Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria *in vitro*. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 49:151-161.
- De Veth, M. J., and E. S. Kolver. 2001. Digestion of Ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 84:1449-1457.
- Demeyer, D. L., and C. J. Van Nevel. 1986. Influence of substrate and microbial interaction on efficiency of rumen microbial growth. *Reprod. Nutr. Dev.* 26:161-179.

- Dijkstra, J., and A. Bannink. 2000. Analyses of modelling whole-rumen function. Pages 299-322 in *Feeding System and Feed Evaluation Models*. CAB International. M. K. Theodorou and J. France (eds). Wallingford, UK.
- Dijkstra, J., J. France, and D. R. Davies. 1998. Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. *J. Dairy Sci.* 81:3370-3384.
- Erasmus, J. L., P. M. Botha, and H. H. Meissner. 1994. Effect of protein source on ruminal fermentation and passage of amino acids to the duodenum to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 77:3655-3665.
- Erfle, J. D., R. J. Boila, R. M. Teather, S. Mahadevan, and F. D Sauer. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 65:1457-1464.
- Fahey, G. C., Jr., L. D. Bourquin, E. C. Titgemeyer, and D. G. Atwell. 1993. Postharvest treatment of fibrous feedstuffs to improve their nutritive value. Pages 715-766 in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, J. Ralph (eds). Madison, WI, USA.
- France, J. and R. C. Siddons. 1993. Volatile fatty acid production. Pages 107-121 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- Grant, R. J., V. F. Colenbrander, and D. R. Mertens. 1990. Milk fat depression in dairy cows: Role of particle size of alfalfa hay. *J. Dairy Sci.* 73:1823-1833.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. Symposium: Protein and fiber digestion, passage and utilization in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 69:2755-2766.
- Hoover, W. H., and S. R. Stokes. 1991. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74:3630-3644.

- Hoover, W. H., and T. K Miller. 1996. Contributions of microbial protein to amino acid supply. Pages 199-206 in Proceeding of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. October 22-24th, 1996. Rochester NY, USA.
- Hoover, W. H., C. R. Kincaid, G. A. Varga, W. V. Thaine, and L. L. Junkin, Jr. 1984. Effects of solid and liquid flows on fermentation in continuous culture. IV. pH and dilution rate. *J. Anim. Sci.* 58:692-699.
- Hoover, W. H., P. H. Knowlton, M. D. Stern, and C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on fermentation parameters in continuous culture of rumen contents. *J. Anim. Sci.* 43:535-542.
- Hoover, W. H., R. J. Crawford, and M. D. Stern. 1982. Effects of solid and liquid flows on fermentation in continuous culture. III. Solid retention time. *J. Anim. Sci.* 54:849-854.
- INRA. 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. R. Jarrige (éd). INRA Publications. Paris, France.
- Lallès, J. P., C. Poncet, and R. Toullec. 1992. Composition en acides amines des bactéries libres et des bactéries fixées aux particules alimentaires du retículo-rumen du veau sevré et du mouton recevant différentes rations. *Ann. Zootech.* 41:75-76.
- Lana, R. P., J. B. Russell, and M. E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76:2190-2196.
- Lechner-Doll, M., M. Kaske, and W. Vo Engerhardt. 1991. Factors affecting the mean retention time of particles in the forestomachs of ruminants and camelids. Pages 455-482 in *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima (eds). Academic Press, San Diego, CA.
- Lescoat, P., and D. Sauvant. 1995. Development of a mechanistic model for rumen digestion validated using the duodenal flux of amino acids. *Reprod. Nut. Dev.* 35:45-70.

- Mackie, R. I., and B. A. White. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: Potential impact on nutrient output. *J. Dairy Sci.* 73:2971-2995.
- Martin, C, L. Bernard, and B. Michalet-Doreau. 1996. Influence of sampling time and diet on amino acid composition of protozoa and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *J. Anim. Sci.* 74:1157-1163.
- McCarthy, R. D., Jr., T. H. Klusmeyer, J. L. Vicini, J. H. Clark, and D. R. Nelson. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016.
- Mould, F. L., E. R. Ørskov, and S. O. Mann. 1983. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> rev. ed. National Academic Press, Washington, DC.
- Nolan, J. V. 1993. Nitrogen kinetics. Pages 123-143 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. J. M. Forbes and J. France (eds). CAB International, London and NY.
- O'Connor, J. D., C. J. Sniffen, D. G. Fox., and W. Chalupa. 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV Predicting amino acid adequacy. *J. Dairy Sci.* 71:1298-1311.
- Ørskov, E. R. 1988. *Nutrición proteica de los rumiantes*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Ranilla, M. J., M. D. Carro, y M. L. Tejido. 2001. Comparación de diversos métodos de desligamiento de bacterias ruminales asociadas a la fase sólida de la digesta en un sistema *in vitro* (Rusitec). *ITEA 22 (Vol. Extra):* 382-384.

- Reynolds, C. K., H. F. Tyrrell, and P. J. Reynolds. 1991. Effects of forage to concentrate ratio and intake on energy metabolism in growing beef heifers: whole body energy and nitrogen balance and visceral heat production. *J. Nutr.* 121:994-1003.
- Rode, L. M., D. C. Weakley, and L. D. Satter. 1985. Effect of forage amount and particle size in diets of lactating dairy cows on site of digestion and microbial protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.* 65:101-111.
- Rodríguez, C. A., J. González, M. R. Alvir, J. L. Repetto, C. Centeno, and F. Lamrani. 2000. Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. *Br. J. Nutr.* 84 :369-376.
- Rulquin, H., and R. Vérité. 1993. Amino acid nutrition of dairy cows: productive effects and animal requirements. Pages 55-77 in: *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, UK.
- Rulquin, H., J. Guinar, and R. Vérité. 1998. Variation in amino acid content in the small intestine digesta of cattle. Development of a prediction model. *Livestock Prod. Sci.* 53:1-13.
- Russell, J. B. 1998a. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76:1955-1963.
- Russell, J. B. 1998b. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 81:3222-3230.
- Russell, J. B., and D. B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:604-610.
- Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *J. Dairy. Sci.* 79:1503-1509.
- Russell, J. B., and H. J. Strobel. 1987. Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 70:970-976.

- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A Net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *J. Anim. Sci.*, 70:3551-2561.
- Santos, K. A., M. D. Stern, and L. D. Satter. 1984. Protein degradation in the rumen and amino acids absorption in the small intestine of lactating dairy cattle fed various protein sources. *J. Anim. Sci.* 58:244-255.
- Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Schadt, I., W. H. Hoover, T. K. Miller, W. V. Thayne, and G. Licitra. 1999. Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 77:485-491.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, and W. V. Thayne. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69:413-419.
- Smith, W. R., I. Yu, and R. E. Hungate. 1973. Factors affecting cellulolysis by *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.* 414:729-737.
- Stern, M. D., and W. H. Hoover. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. *J. Anim. Sci.* 49:1590-1603.
- Stern, M. D., G. A. Varga, J. H. Clark, J. L. Firkins, J. T. Huber, and D. L. Palmquist. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 77:2762-2786.
- Stern, M. D., L. M. Rode, R. W. Orange, R. H. Stauffacher, and L. D. Satter. 1983. Ruminant protein degradation of corn gluten meal in lactating dairy cattle fitted with duodenal T-type cannulae. *J. Anim. Sci.* 56:194-205.
- Stokes, S. R., W. H. Hoover, T. K. Miller, R. Blauweikel. 1991. Ruminant digestion and microbial utilization of diets varying in type of carbohydrate and protein. *J. Dairy Sci.* 74:871-880.

- Tamminga, S. 1993. Influence of feeding management on ruminant fiber digestibility. Pages 571-602 in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (eds). ASSA-CSSA-SSSA, Madison, WI. USA.
- Van Houtert, M. F. J. 1993. The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 43:189-225.
- Van Soest. P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Second Edition. Comstock Publishing associates. Cornell University Press, USA.
- Wallace, R. J., and M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pages 217-249 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson (ed). Elsevier Applied Science. London, England.
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76:3114-3122.
- Whitehouse, N. L., V. M. Olson, C. G. Schwab, W. R. Chesbro, K. D. Cunningham, and K. D. Lycos. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72:1335-1343.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001a. Effect of grain processing, forage to concentrate ratio and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:2203-2216.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001b. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2736-2746.



CAPÍTULO 6  
**Conclusiones**

**En base a los resultados observados, bajo las condiciones experimentales en las cuales se llevó a cabo la presente Tesis Doctoral, cuyos objetivos principales fueron evaluar los factores que afectan a la fermentación microbiana, y al perfil y flujo de aminoácidos de origen microbiano considerando la composición de las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida en un sistema de cultivo continuo de flujo doble, podemos concluir lo siguiente:**

1. Los efectos del nivel de fibra en la ración, el tamaño de partícula del forraje, el pH y la tasa de dilución de sólidos sobre la fermentación microbiana, el perfil y el flujo de aminoácidos de origen microbiano fueron similares a los observados *in vivo* por otros autores, aunque la magnitud de los efectos fueron diferentes.
2. Ni el nivel de fibra en la dieta ni el tamaño de partícula del forraje provocaron variaciones importantes en la digestibilidad de la MS, MO o fibra. Las condiciones de pH bajo y la tasa de dilución de sólidos rápida redujeron la digestibilidad de la MS, MO, y fibra.
3. La producción y proporción de AGV depende, fundamentalmente, de la disponibilidad de substratos fermentables para el crecimiento microbiano. Sin embargo, las condiciones de pH bajo, y no el aporte de carbohidratos no fibrosos en la dieta, fue el factor que mayor impacto negativo tuvo en la producción y proporción de AGV producidos. La menor relación acetato: propionato observada con el pH bajo se produjo como consecuencia de la disminución en la proporción molar de acetato y no por el incremento en la proporción de propionato.

4. La disminución del contenido de proteína en la dieta, la inclusión de dosis intermedias del aditivo REGEPRO<sup>®</sup> y el pH bajo fueron los principales factores involucrados en la reducción de la concentración de N amoniacal. Sin embargo, en ningún caso fue inferior a los 5 mg/100 mL, señalado como la concentración mínima necesaria para optimizar la síntesis de proteína microbiana en experimentos *in vitro*.
5. Las muestras bacterianas obtenidas de las fracciones líquida (BL) y sólida (BS) del fermentador mostraron diferencias importantes en su composición química en lo que se refiere al contenido en nitrógeno y bases púricas (BL > BS). Dichos resultados fueron independientes de los factores principales evaluados.
6. Los valores estimados de flujo de proteína microbiana y eficiencia de síntesis de proteína microbiana resultaron muy variables entre experimentos. Este hecho cuestiona el uso de un valor constante para la eficiencia de síntesis de proteína microbiana por parte de la mayoría de los actuales sistemas de racionamiento proteico para el vacuno lechero.
7. La reducción del tamaño de partículas del forraje y el incremento en la tasa de dilución de sólidos favorecieron el flujo de proteína microbiana debido a una mayor eficiencia microbiana bajo esas condiciones de fermentación. Sin embargo, el efecto o la magnitud de las diferencias observadas fueron dependientes de la población bacteriana utilizada como referencia en los cálculos.
8. Cuando se comparó el perfil de aminoácidos esenciales entre las bacterias obtenidas de las fracciones líquida y sólida del fermentador para un mismo tratamiento, las diferencias fueron estadísticamente significativas, aunque biológicamente poco importantes.
9. Sin embargo, las diferencias en el perfil medio de AA esenciales entre las bacterias obtenidas de las fracciones líquida y sólida del fermentador fueron escasas.

10. El flujo estimado de AA de origen microbiano varió con el nivel de fibra en la ración y la tasa de dilución de sólidos. A diferencia de lo observado con el perfil, las variaciones en el flujo pueden considerarse estadística y biológicamente importantes, aunque el efecto o la magnitud de las diferencias observadas fueron dependientes de la población bacteriana utilizada como referencia en los cálculos. Por lo tanto, la estimación precisa del flujo de AA de origen bacteriano al intestino delgado debe considerar las condiciones de fermentación ruminal, la composición química y la contribución parcial de los grupos bacterianos.
11. Dado que el perfil de aminoácidos entre las bacterias asociadas con las fracciones líquida y sólida del fermentador varió poco, el factor responsable de las diferencias observadas en el flujo de aminoácidos de origen bacteriano fue la estimación del flujo de materia seca microbiana (dependiente de la relación N:bases púricas).

## FE DE ERRATAS

<b>Pág.</b>	<b>Párrafo</b>	<b>Línea</b>	<b>Dice</b>	<b>Debería decir</b>
20	2	2	factores que la afectan...	factores que afectan...
30	1	5	en el la...	en la...
37	3	6	que se reseñada...	reseñada...
38	3	10-11	Jalc y Laukova, 2002	Jalc <i>et al.</i> , 2002
43	3	10	corroboran...	corroborar ...
45	2	17	(1.20 vs 1,21, 1.33 g n bact/d)	(1.20 vs 1.21 g n bact/d)
48	2	5	las diferencias ...	la diferencia ...
58	3	12	kg MOVF ...	g MOVF ...
62	3	3	alimetación ...	alimentación ...
92	1	5	withouth	without
142	2	3	passage rate increase...	passage rate decrease
143	2	1	effect of pH and solid ...	effects of pH and solid...
143	2	4	Is that it ...	Is that if ...
149	2	2	SDDR compared FSDR ...	SDDR compared with FSDR ...
156	1	1	(2001)	(2000)
176	2	11	con en ...	con el ...
191	2	4	regresión y determinación...	regresión y correlación...