

## USO DEL DAPA COMO ÍNDICE CORRECTOR DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN EL RESIDUO DE INCUBACIÓN EN DIFERENTES SUBPRODUCTOS PROTEICOS Y AMBIENTES RUMINALES

Seradj, A.R., De la Fuente, G., Villalba, D., Tor, M., García, C., Armengol, R., Costa, S. y Balcells, J.

Departament de Ciència Animal. UdL– Agrotecnio Center; gfuente@ca.udl.cat

### INTRODUCCIÓN

El establecimiento de la cinética de degradación permite evaluar la cantidad de proteína de origen dietético que alcanza el duodeno y con ello racionar a los animales con una mayor precisión. Convencionalmente la degradabilidad efectiva (DE) de los alimentos se determina mediante la utilización de animales canulados en el rumen y bolsas de nylon® donde se simula el proceso de degradación ruminal del alimento y es por ello que el ambiente ruminal juega un papel crucial en dicho proceso (Nagadi et al., 2000). El uso de raciones con elevadas proporciones de cereales es una práctica común en el cebo de terneros en el área mediterránea y aunque afecta negativamente al número de bacterias celulolíticas y protozoos ruminales (Newbold et al., 2015), su influencia específica sobre la DE de la proteína no ha sido fehacientemente demostrada. La mayoría de la información existente en cuanto a DE de la proteína está basada en animales alimentados con dietas más forrajeras (Vanzant et al., 1998); por tanto, actualizar esos valores para dietas concentradas es esencial para determinar y poder optimizar el aporte de proteína no degradable que llega al duodeno. El ácido diaminopimélico (DAPA) es un aminoácido que se localiza en los polipéptidos de la pared celular de las bacterias y por tanto es un marcador bacteriano (Ling y Buttery, 1978). Fue el marcador microbiano interno de elección en los años 80-90 pero dadas sus dificultades analíticas fue sustituido por otros marcadores, como las purinas o el <sup>15</sup>N (Perez et al., 1997).

El presente trabajo pretende estudiar el efecto del ambiente ruminal sobre la DE de varios suplementos proteicos; para ello, se utiliza el DAPA como marcador microbiano, analizado mediante una técnica de monitorización de reacciones múltiples (MRM) implementada sobre un sistema UPLC-TQS.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Cuatro terneros macho, de raza Holstein de 6 meses de edad y 300 kg de peso vivo con cánulas ruminales recibieron dos raciones experimentales; una ración compuesta de pienso y paja *ad libitum* (PP, aproximadamente 7% de consumo de paja de cereal) y una ración completa mezclada (RCM) tipo “unifeed” diseñada para un aporte equilibrado de forraje y concentrado (Relación F:C 50:50). La transición entre dietas llevó un periodo de adaptación de 14 días. Un total de cinco alimentos se incubaron en bolsas de nylon® (trigo, granos de destilería de maíz desecados con solubles (DDGS), soja 44, palmiste y tercerillas) en el rumen de los animales canulados siguiendo el protocolo propuesto por Ørskov y McDonald (1979). Tras la incubación, las bolsas se retiraron del rumen, se lavaron bajo un flujo de agua continuo y se secaron en estufa de 60°C durante 48h, para determinar su contenido en materia seca. Los residuos se analizaron para estimar su contenido en Nitrógeno (N) mediante la técnica Dumas (AOAC 2005), y la relación DAPA:N mediante una modificación del método propuesto por Guo et al. (2013), descrita para la cuantificación de aminoácidos. Este método utiliza la combinación de la cromatografía líquida de alta resolución (UPLC) con la espectrometría de masas (TQS) en material previamente hidrolizado. La contribución bacteriana de la fracción no degradada de los alimentos se obtuvo calculando la relación DAPA:N en la fracción de bacterias asociadas a la fase sólida (BAS); el concentrado de BAS se obtuvo de acuerdo a Martín-Orúe et al. (1998).

La degradabilidad efectiva real del N (DER) se obtuvo al sustraer la parte bacteriana del N remanente en las bolsas de nylon® tras 48h (24h en las bolsas de soja 44); el porcentaje de contaminación bacteriana se estableció como la relación entre el N de origen bacteriano y el N dietético en el residuo de incubación; la relación entre la degradabilidad efectiva aparente (DEA) y la DER se analizó aplicando modelos de regresión lineal. El efecto del ambiente ruminal sobre la DEA, DER y el porcentaje de contaminación bacteriana se analizó mediante ANOVA para un nivel de significación de P<0,05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las degradabilidad real y aparente del N registrada con la ración RCM fue superior a la registrada con PP, ( $P < 0,01$  en todos los casos, ver Tabla 1), aunque las diferencias fueron más acusadas en alimentos que mostraron la menor degradabilidad del N (Soja 44 y Palmiste).

**Tabla 1.** Efecto del ambiente ruminal sobre la Degradabilidad del N a las 48h ( $\dagger 24h$ ) en diferentes subproductos alimentarios.

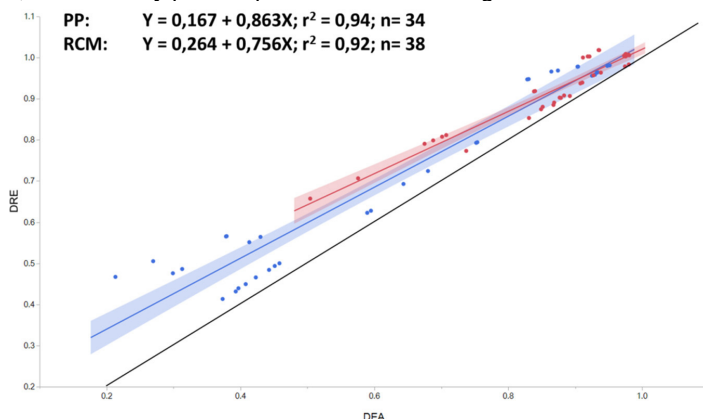
	Dietas <sup>a</sup>			P
	PP	RCM	EEM <sup>b</sup>	
<b>Degradabilidad aparente del N</b>				
Trigo	0,937	0,976	0,0019	<0,001
DDGS	0,669	0,897	0,0141	<0,001
Soja 44 $\dagger$	0,418	0,875	0,0149	<0,001
Palmiste	0,337	0,691	0,0244	<0,001
Tercerillas	0,867	0,922	0,0072	0,003
<b>Degradabilidad real del N (sin contribución de N bacteriano)</b>				
Trigo	0,967	1,006	0,0019	<0,001
DDGS	0,709	0,924	0,0146	<0,001
Soja 44 $\dagger$	0,460	0,893	0,0132	<0,001
Palmiste	0,523	0,801	0,0178	<0,001
Tercerillas	0,964	1,007	0,0034	<0,001
<b>Porcentaje del N no degradado de origen bacteriano</b>				
Trigo	50,1	124,0	3,75	<0,001
DDGS	12,9	28,6	2,89	0,002
Soja 44 $\dagger$	7,1	15,5	0,54	<0,001
Palmiste	27,8	37,9	2,06	0,004
Tercerillas	73,9	110,8	4,12	<0,001

<sup>a</sup>PP: dieta concentrada a partir de pienso y paja de cereal; RCM: Ración completa mezclada con una relación F:C 50:50. <sup>b</sup>error estándar de la media (n=6).

El porcentaje de N bacteriano presente en la fracción no degradada mostró bastante heterogeneidad entre los alimentos estudiados pero fue siempre superior en dietas RCM que en PP (Tabla 1). La correlación entre DEA y DER mostró pendientes inferiores a 1 ( $r^2 > 0,9$ ) y que difirieron en función de la ración suministrada, así cuando los terneros ingerieron RCM, las pendientes fueron menos pronunciadas. Cuando se compararon los alimentos incubados, los alimentos menos degradables mostraron mayores niveles de contaminación y consiguientemente las diferencias estimadas entre DEA y DER fueron más acusadas (Figura 1). Palmiste y tercerillas, caracterizados por su elevado nivel de fibra mostraron las menores pendientes (0,77 y 0,65, respectivamente), mientras que el resto de alimentos mostró pendientes más elevadas ( $> 0,95$ ), indicando una relación clara entre el grado de contaminación bacteriana y el nivel de fibra en el alimento, condición esencial para la adhesión del BAS. Considerando la diferencia entre pendientes, su intersección (0,909) correspondería al nivel de degradabilidad a partir del cual el ambiente ruminal no influiría sobre su estimación.

La relación DAPA:N observada en la fracción sólida (entre 11 y 17 mg/g N) obtuvo unos valores inferiores a los observados en la literatura (Legay-Carmier y Bauchart, 1989 (24 mg/g N); Demeyer, 1982 (50 mg/g N)); no obstante, teniendo en cuenta la laboriosidad de la técnica original (Czerkawski, 1974), los valores obtenidos en el presente estudio pueden estar más cercanos a los valores reales, al tratarse de un método más directo y por tanto

con menos influencia de errores derivados del manejo en el laboratorio. Como conclusión, el ambiente ruminal afecta en gran medida a la valoración de la degradabilidad *in situ* de la proteína y la estimación del N de origen microbiano mediante la concentración de DAPA es un método útil, económico y preciso para determinar la degradabilidad efectiva real.



**Figura 1.** Relación entre Degradabilidad aparente (DEA) y real (DER) del N en animales bajo dieta PP (azul) y bajo dieta RCM (rojo). La línea negra indica la recta de regresión de pendiente 1 e intercepto 0 ( $Y = 1X$ ).

**Agradecimientos:** Este estudio ha sido financiado por el proyecto GenTORE, perteneciente al programa H2020 (Referencia 727213).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC.2005. Official Methods of Analysis. Dumas method (990.03)
- Demeyer, D., Todorov, N., Van Nevel, C., & Vets, J. 1982. J. An. Phy. An. Nutr. & Feed Sci. 48: 21-32.
- Czerkawski, J.W., 1974. J. Sci. Food Agric. 25: 45-55.
- Guo, S., Duan, J. A., Qian, D., Tang, Y., Qian, Y., Wu, D., & Shang, E. 2013. J. Agr. & Food Chem. 61: 2709-2719.
- Legay-Carmier, F., & Bauchart, D. 1989. Br. J. Nutr. 61: 725-740.
- Ling, J.R. & Buttery, P.J. 1978. Br. J. Nutr. 39: 165-179.
- Martín-Orúe, S. M., Balcells, J., Zakraoui, F., & Castrillo, C. 1998. An. Feed Sci. & Tech. 71: 269-282.
- Nagadi, S., Herrero, M., & Jessop, N. S. 2000. An. Feed Sci. & Tech. 87: 231-239.
- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. 2015. Front. Micr. 6: 1313.
- Ørskov, E. R., & McDonald, I. 1979. J. Agr. Sci. 92: 499-503.
- Pérez, J. F., Balcells, J., Guada, J. A., & Castrillo, C. 1997. J. An. Sci. 65:225-236.
- Vanzant, E. S., Cochran, R. C., & Titgemeyer, E. C. 1998. J. An. Sci. 76: 2717-2729.

#### USE OF DAPA AS CORRECTION FOR ESTIMATING APPARENT DEGRADABILITY OF PROTEIN BY-PRODUCTS IN DIFFERENT RUMINAL ENVIRONMENTS

**ABSTRACT:** The aim of this study was to investigate the effect of the rumen environment on the *in situ* degradability of the protein in several feedstuffs, as well as the extent of N bacterial contribution by a novel analysis of the DAPA concentration from the residue. Four male Holstein cannulated were used for this purpose. Nylon bags with the selected feedstuffs were incubated for 48 h under two different rumen environments: PP, where calves were fed a high concentrate (>90%) diet with cereal straw, and RCM, with a diet based on a total mixed ration (ratio F:C 50:50). In all cases, *in situ* degradability was higher in RCM than in PP, showing that the right election of the rumen environment is essential for the proper evaluation of feedstuffs. Relation between apparent and real effective degradability in both environments indicated that feedstuffs with lower degradability presented a higher proportion of bacterial contamination, fact that was more pronounced in RCM environments.

**Keywords:** DAPA; *in situ* degradability; protein; rumen.