

## Efeito da Acidez no Controle da Produção de Amônia e Crescimento Microbiano<sup>1</sup>

Rogério de Paula Lana<sup>2</sup>, Luciane Tavares da Cunha<sup>3</sup>, Arnaldo Chaer Borges<sup>4</sup>

**RESUMO** - Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da acidez pela adição de níveis crescentes de amido sobre a degradação da caseína hidrolisada (tripticase). Utilizou-se o líquido de rúmen de um novilho fistulado recebendo 40% de ração concentrada. As incubações foram feitas anaerobicamente a 39°C. Utilizaram-se 150 mg de tripticase e 0, 25, 50, 75, 100, 200 e 300 mg de amido em 10 mL de líquido de rúmen. Foram coletadas amostras ao longo das incubações para análises de pH, amônia e proteína microbiana. O amido teve pequeno efeito sobre o crescimento microbiano, mas os níveis igual ou acima de 50 mg/10 mL de líquido de rúmen inibiram totalmente a produção de amônia. Esta inibição foi certamente devido ao efeito do pH, pois este teve maior correlação com a produção de amônia que o amido (0,95 vs -0,59). Uma vez que a maior parte da utilização da caseína hidrolisada foi para a produção de amônia e que esta foi altamente inibida pela acidez, conclui-se que o moderado abaixamento do pH ruminal, pelo uso de concentrado, pode acarretar redução na perda de proteína alimentar por fermentação. Portanto, maior quantidade de proteína degradável pode ser adicionada à ração, justificando o benefício do sincronismo de fontes de carboidrato e proteína, quanto às suas degradabilidades, ao se formularem rações para ruminantes.

Palavras-chave: amônia, desaminação, fermentação, pH, proteína, rúmen

### Acidity Effect (pH) in Regulating Ammonia Production and Microbial Growth

**ABSTRACT** - This research had as objective the evaluation of the acidity effect (pH) by adding increasing levels of corn starch on the degradation of hydrolyzed casein (Tripticase). The rumen fluid was taken from a fistulated steer in a 40% concentrate diet, and centrifuged at 500xg in 15 minutes to remove feed particles and protozoa. The incubations were done in an anaerobic environment at 39°C in Vacutainer® tubes. It was used 150 mg of tripticase and 0, 25, 50, 75, 100, 200 and 300 mg of corn starch in 10 mL rumen fluid. Samples were collected over the incubations and the pH, ammonia and microbial protein measured. The starch had small effect on microbial growth, but levels of 50 mg/10 mL and on completely inhibited the ammonia production. The inhibition was probably due to pH effect, since it showed higher correlation with ammonia production than the starch (0.95 vs. -0.59). Once the largest amount of tripticase was used for ammonia production, and that it was highly inhibited by acidity, mild decrease in ruminal pH by the use of concentrate can be useful to reduce losses of dietary protein by ruminal fermentation. In fact, higher amount of degradable protein could be added to the diet, helpfully the benefit of the synchronism of the starch and protein sources, as for their degradations, in the formulation of diets for ruminant animal.

Key Words: ammonia, deamination, fermentation, pH, protein, rumen

### Introdução

A fermentação da proteína no rúmen pode, muitas vezes, produzir mais amônia que os microrganismos podem utilizar, ocasionando mais de 25% de perda da proteína, na forma de nitrogênio amoniacal (RUSSELL et al., 1992). A taxa de degradação excessiva de proteínas no rúmen pode causar, ainda, redução no suprimento de aminoácidos para o ruminante, em nível de intestino delgado, e aumento na poluição ambiental próximo às bacias leiteiras (YECK et al., 1975; NOLAN et al., 1976). Devido a estes fatores e ao fato de as proteínas serem componentes

alimentares de alto custo em dietas para ruminantes, tem sido de interesse dos nutricionistas reduzir a fermentação excessiva desses nutrientes.

O acúmulo de amônia no rúmen apresenta relação inversa com o nível de amido na ração, na qual o efeito do nível de amido tem sido creditado à assimilação da amônia no aumento do crescimento microbiano, em vez de um efeito sobre a redução da desaminação de aminoácidos (ANNISON, 1956). Entretanto, ERFLE et al. (1982) demonstraram que a produção de amônia pela microbiota ruminal *in vitro* foi deprimida pelo abaixamento do pH e LANA et al. (1998) verificaram que o aumento do nível de con-

<sup>1</sup> Parte da tese de Mestrado do segundo autor - projeto financiado pela FAPEMIG.

<sup>2</sup> Professor do Departamento de Zootecnia - UFV - 36.571-000 - Viçosa - MG; E-mail: rlana@mail.ufv.br

<sup>3</sup> Mestre em Microbiologia Agrícola - UFV - 36.571-000 - Viçosa - MG; Bolsista do CNPq.

<sup>4</sup> Professor do Departamento de Microbiologia - UFV - 36.571-000 - Viçosa - MG.

centrado na dieta de bovinos reduz o pH ruminal e, também, causa diminuição na atividade desaminadora de aminoácidos.

A degradabilidade das proteínas dos alimentos pode ser estimada por uma técnica de incubação *in vitro*, em que as bactérias ruminais são cultivadas com a adição de fontes de proteínas associadas a diferentes níveis de amido, para se determinar a produção de amônia no nível zero de produção de gases (RAAB et al., 1983; BARTLE et al., 1986). Esta técnica tem como vantagem avaliar o efeito do pH, entre outros fatores, sobre a degradação da proteína.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da acidez sobre a degradabilidade da tripticase, associado a níveis crescentes de amido, com base no monitoramento da produção de amônia, o desaparecimento dos peptídeos do meio de cultura e o crescimento microbiano.

### Material e Métodos

Foi utilizado líquido de rúmen de um novilho recebendo 40% de concentrado (pH inicial de 6,2). O líquido foi coletado 2 a 3 horas após o arraçoamento, filtrado em quatro camadas de gaze, acondicionado em garrafa térmica com fechamento hermético e transportado imediatamente para o laboratório. Em seguida, foi centrifugado a 500xg por 15 minutos, a 25°C, para sedimentação de partículas dos alimentos e protozoários, e o sobrenadante foi utilizado nas incubações. As incubações foram feitas 39°C, utilizando-se tubos Vacuntainer® com vedação hermética contendo 150 mg de tripticase e 0, 25, 50, 75, 100, 200 e 300 mg de amido em 10 mL de líquido de rúmen.

Amostras do meio de cultura foram coletadas ao longo das incubações com o uso de seringas, de modo a manter a anaerobiose dentro dos tubos. O líquido coletado foi centrifugado em tubos eppendorf a 5200xg por 10 minutos e o sobrenadante, transferido para outros tubos eppendorf e congelados para posteriores análises de amônia e peptídeos. A análise de amônia foi feita pelo método colorimétrico de CHANEY e MARBACH (1962) e a de peptídeos, pelo método de LOWRY et al. (1951). Foram ainda coletadas amostras ao longo das incubações, sendo centrifugadas em tubos eppendorf a 5200xg por 10 minutos e o *pelet* ressuspenso duas vezes em solução salina a 0,9% para análise da proteína microbiana. A determinação da proteína microbiana foi feita pelo método de LOWRY et al. (1951).

As taxas de produção de amônia foram obtidas

pela derivada primeira das equações de regressão polinomial, utilizando-se o tempo em que a derivada segunda se igualava a zero. Foram utilizadas sete concentrações de amido, conforme descrito anteriormente, em 10 mL de líquido de rúmen, com três repetições, totalizando 21 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi obtida pela média de duas análises laboratoriais. Análises de correlações lineares dos parâmetros foram feitas pelo programa MINITAB (1994).

### Resultados e Discussão

O nível de amido igual ou acima de 50 mg/10 mL de líquido de rúmen inibiu a produção de amônia (Figura 1A), apresentou pequeno efeito sobre o crescimento microbiano (Figura 1B) e causou a acidificação do meio de cultura (Figura 1C). O pH final de incubação (76 horas) atingiu o valor mínimo de 4,8, com a adição de 50 mg de amido ao líquido ruminal, e foi ligeiramente reduzido pelos níveis mais elevados (Figura 2).

Os efeitos dos níveis de amido e do pH final sobre a produção (Figuras 3A e 3B) e taxa de produção de amônia (Figuras 3C e 3D) evidenciaram que a atividade desaminadora atingiu o mínimo com 50 mg de amido/10 mL de líquido ruminal e que a taxa de produção de amônia decresceu linearmente com a abaixamento do pH. Verifica-se que a acidez foi o fator responsável pelos efeitos observados, uma vez que o amido não proporcionou respostas adicionais para concentrações acima de 50 mg. Provavelmente, o acúmulo de ácidos graxos voláteis e o abaixamento do pH para o valor mínimo de 4,8 inibiram toda a ação fermentativa, desde a fermentação de aminoácidos até a fermentação do amido.

O nível de peptídeos proveniente da tripticase e remanescente no meio de cultura foi menor em níveis mais baixos de amido e mais alto de pH (Figuras 4A e 4B), indicando que os peptídeos foram usados principalmente para a produção de amônia (Figuras 3A e 3B), uma vez que a proteína microbiana possuía também níveis baixos nestas condições (Figuras 4C e 4D).

A maior utilização do nitrogênio total após 76 horas de incubação foi verificada em meio com o pH 7,2, quando 52% dos peptídeos foram utilizados para a produção de amônia (Figuras 5A e 5B). À medida que ocorreu a acidificação do líquido ruminal, houve redução acentuada na produção de amônia e na utilização do N-total (15% no pH final de 4,4), sem, contudo, afetar o crescimento microbiano.

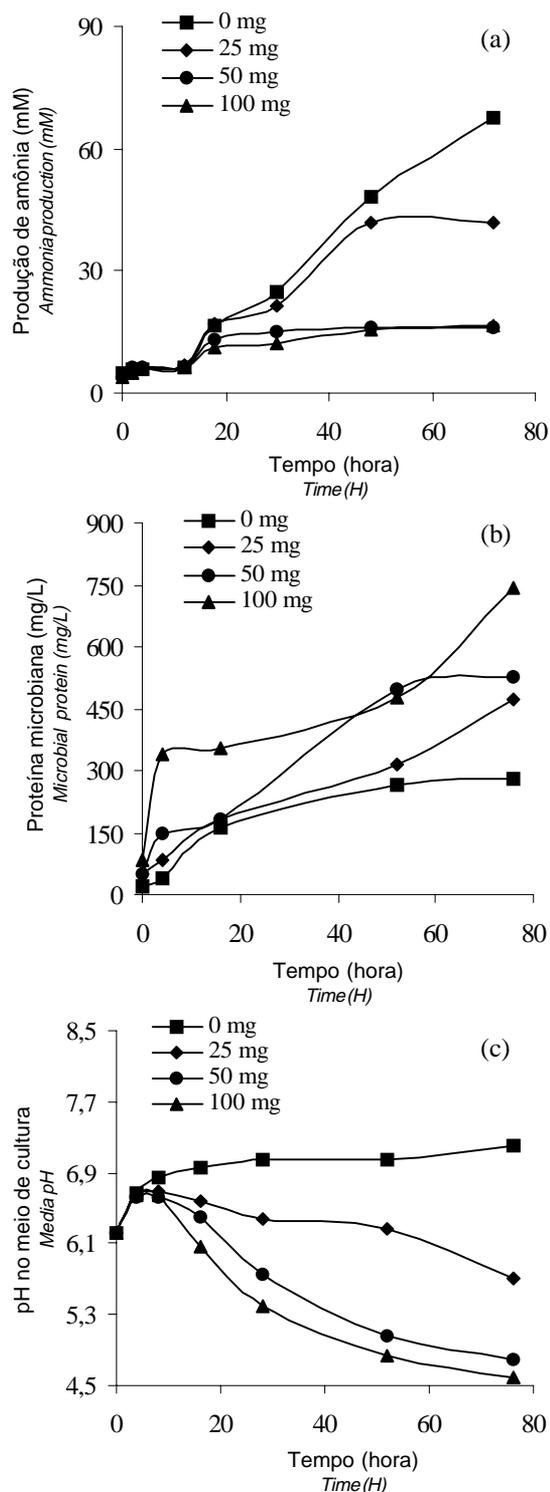


Figura 1 - Efeito de níveis de amido (mg/10 mL de líquido de rúmen) sobre o acúmulo de amônia (a), proteína microbiana (b) e alterações na acidez (c) ao longo do tempo de incubação em um meio contendo 15 g/L de tripticase. Cada ponto corresponde à média de três observações.

Figure 1 - Effect of starch level (mg/10 mL of rumen fluid) on ammonia accumulation (a), microbial protein (b) and changes in acidity (c) on the incubation in media containing 15 g/L of trypticase. Each point is the average of three observations.

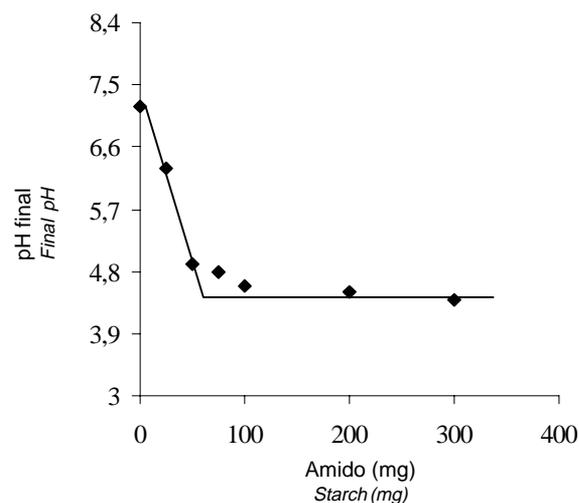


Figura 2 - Efeito de níveis de amido (mg/10 mL de líquido de rúmen) sobre o pH, após 76 horas de incubação, em um meio contendo 15 g/L de tripticase. Cada ponto corresponde à média de três observações.

Figure 2 - Effect of starch level (mg/10 mL of rumen fluid) on pH, after 76 hours of incubation, in media containing 15 g/L of trypticase. Each point is the average of three observations.

Embora CHEN e RUSSELL (1988) tenham afirmado que os microrganismos ruminais utilizam máximo de 20% do nitrogênio total da tripticase em 96 horas de incubação, observou-se que a utilização da tripticase pelos microrganismos ruminais foi pH-dependente.

A relação  $N-NH_3/N$ -microbiano decresceu drasticamente (de 32 para 2) pelo aumento do nível de amido e pela acidificação do meio (Figuras 5C e 5D). Portanto, a redução das perdas ruminais de nitrogênio por fermentação, quando se usam níveis crescentes de proteína facilmente degradável, pode ser minimizada pela adição de maior quantidade de carboidrato fermentecível. Este resultado justifica o benefício do sincronismo de fontes de carboidrato e proteína, quanto às suas degradabilidades, ao se formularem rações para ruminantes (NOCEK e RUSSELL, 1988; RUSSELL et al., 1992; SNIFFEN et al., 1992; e FOX et al., 1992).

De acordo com os coeficientes de correlações lineares, os níveis de amido apresentaram valores elevados de correlação com o pH, às 16 ( $r = -0,79$ ) e 76 horas ( $r = -0,68$ ) de incubação, e com o crescimento microbiano ( $r = 0,79$ ), indicando que o aumento dos níveis de amido causa a acidificação no meio e, também, que a fermentação desse componente fornece energia suficiente para os processos de síntese de proteína

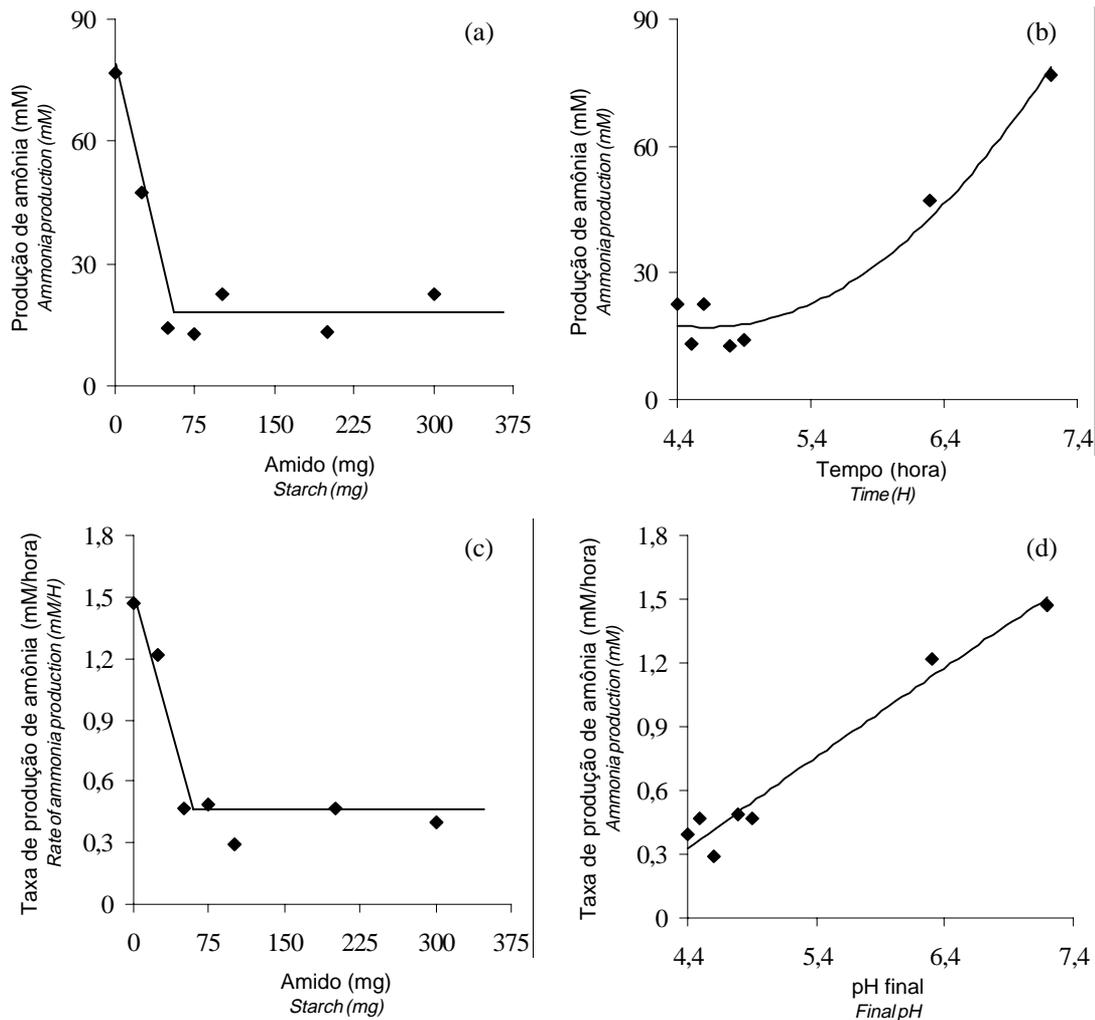


Figura 3 - Efeito de níveis de amido (mg/10 mL de líquido de rúmen) e condição de acidez final sobre a produção total de amônia (a, b) e taxa de produção de amônia (c, d), após 76 horas de incubação em um meio contendo 15 g/L de triptocase. Cada ponto corresponde à média de três observações.

Figure 3 - Effect of starch level (mg/10 mL of rumen fluid) and final acidity on ammonia production (a, b) and rate of ammonia production (c, d), after 76 hours of incubation in media containing 15 g/L of trypticase. Each point is the average of three observations.

microbiana. Entretanto, o amido apresentou valores mais baixos de correlação com a produção e taxa de produção de amônia ( $r = -0,54$  e  $-0,59$ , respectivamente) (Tabela 1).

Os maiores valores de correlação entre o pH às 16 ou 76 horas de incubação, com o crescimento microbiano ( $r = -0,94$  e  $-0,92$ , respectivamente) e a produção e taxa de produção de amônia ( $r = 0,81$  a  $0,95$ ), indicaram que a acidificação do líquido ruminal exerceu papel fundamental no metabolismo do nitrogênio no rúmen, incluindo produção de amônia e crescimento microbiano. O efeito do pH sobre a produção de amônia foi também observado em experimentos *in vivo* por LANA et al. (1998) e *in vitro* por CUNHA et al. (1999).

Com base nos dados, verifica-se que, de acordo com a afirmativa de ANNISON (1956), o efeito do amido sobre a inibição da produção de amônia no rúmen pode ter ocorrido indiretamente pelo abaixamento do pH ruminal, em vez do efeito direto do amido sobre a assimilação da amônia no crescimento microbiano. A grande vantagem da diminuição da atividade proteolítica e desaminadora no rúmen é o conseqüente aumento na quantidade de proteína da dieta que escapa da degradação pelos microrganismos ruminais, aumentando a denominada proteína *by-pass* (ERFLE et al., 1982). Este efeito também pode ser conseguido com a utilização de ionóforos (RUSSELL, 1991).

De acordo com RUSSELL et al. (1992),

Tabela 1 - Coeficientes de correlações lineares entre os parâmetros provenientes da incubação de microrganismos ruminais em um meio contendo 15 g/L de tripticase e níveis crescentes de amido (0, 25, 50, 75, 100, 200 e 300 mg/10 mL)

Table 1 - Linear correlation coefficients among parameters of ruminal microbial incubation in media containing 15 g/l of trypticase and increasing levels of starch (0, 25, 50, 75, 100, 200 and 300 mg/10 mL)

Parâmetros <i>Parameters</i>	Amido (mg) <i>Starch</i>	pH (16 h)	pH final (76 h)	NH <sub>3</sub> (mM/76h)	NH <sub>3</sub> (mM/h)	Proteína Microbiana <i>Microbial protein</i> mg/L - 76 h
pH, 16 h	-0,790					
pH final, 76 h	-0,683	0,893				
NH <sub>3</sub> , mM/76 h	-0,540	0,884	0,916			
NH <sub>3</sub> , mM/h	-0,590	0,805	0,953	0,805		
Proteína microbiana mg/L - 76 h <i>Microbial protein</i>	0,788	-0,939	-0,918	-0,865	-0,835	
Peptídeos (mg/L em 76 h) <i>Peptides</i>	0,644	-0,711	-0,770	-0,748	-0,641	0,803

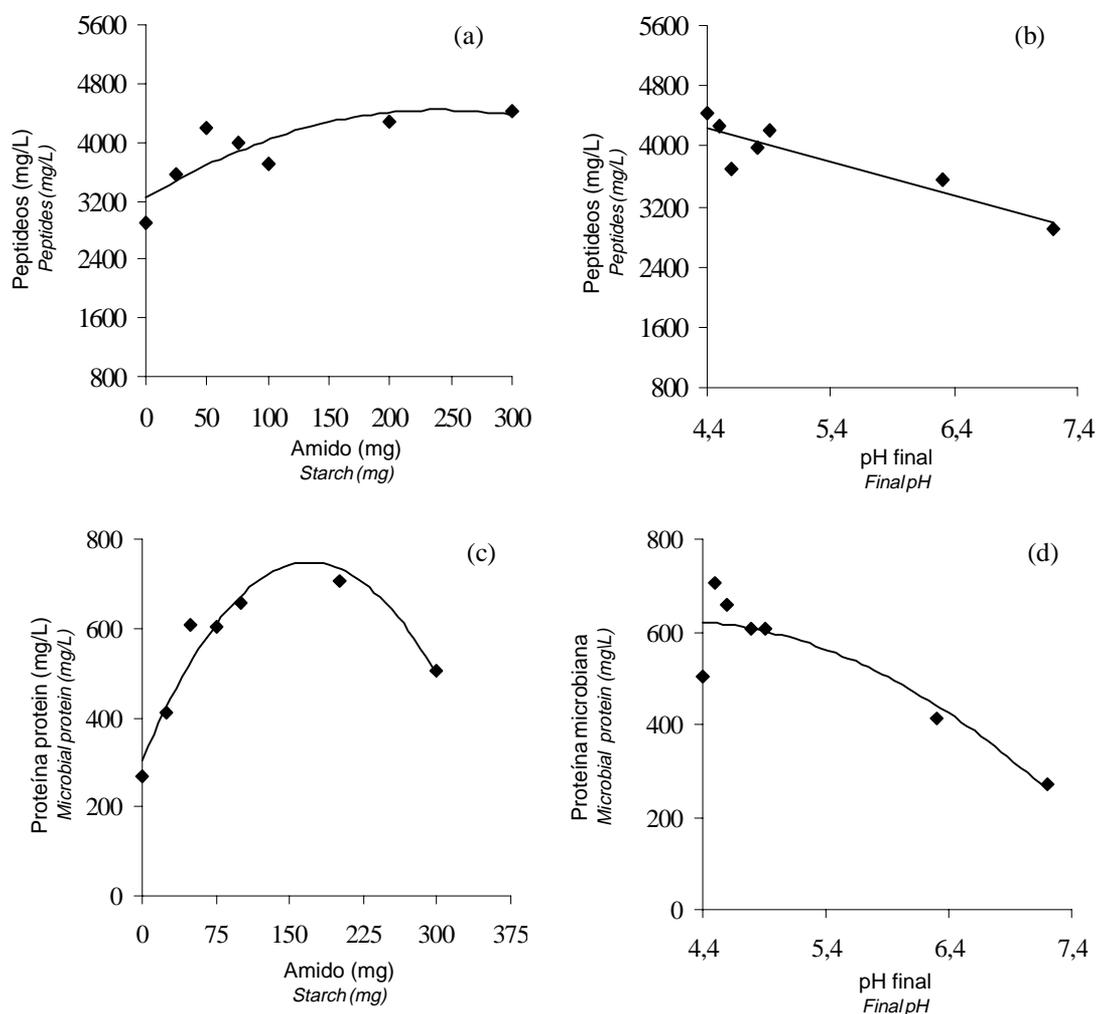


Figura 4 - Efeito de níveis de amido (mg/10 mL de líquido de rúmen) e condição de acidez final sobre a concentração de peptídeos no meio (a, b) e síntese de proteína microbiana (c, d), após 76 horas de incubação em um meio contendo 15 g/L de tripticase. Cada ponto corresponde à média de três observações.

Figure 4 - Effect of starch level (mg/10 mL of rumen fluid) and final acidity condition on media peptide concentration (a, b) and microbial protein synthesis (c, d), after 76 hours of incubation in media containing 15 g/L of trypticase. Each point is the average of three observations.

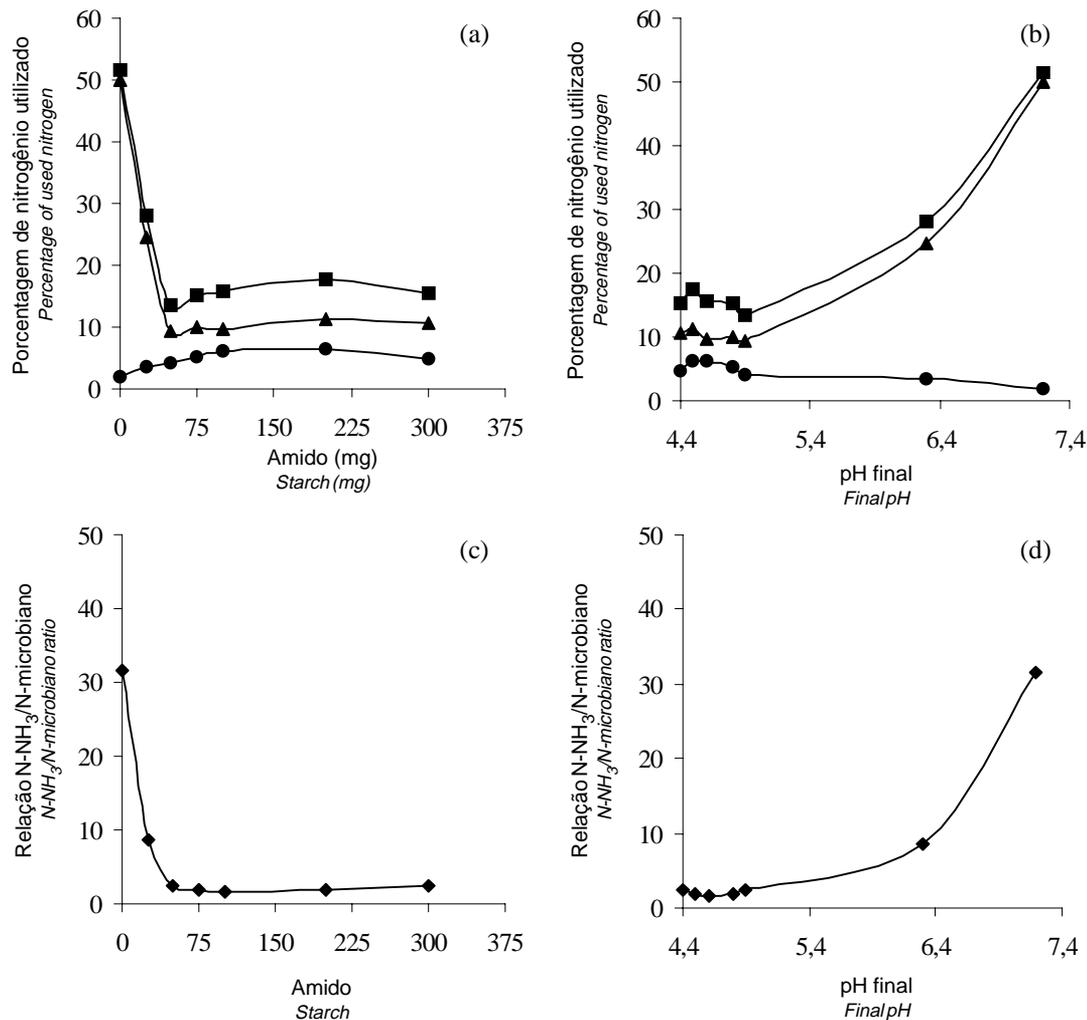


Figura 5 - Efeito de níveis de amido (mg/10 mL de líquido de rúmen) e condição de acidez final sobre a utilização do nitrogênio (N) proveniente da tripticase (15 g/L) após 76 horas de incubação. As figuras acima apresentam os dados referentes à porcentagem do N total utilizado ( $N-NH_3 + N$ -microbiano) (■), N utilizado na produção de amônia (▲) e no crescimento microbiano (●) (a, b) e relação  $N-NH_3/N$ -microbiano (◆) (c, d). Cada ponto corresponde à média de três observações.

Figure 5 - Effect of starch level (mg/10 ml of rumen fluid) and final acidity condition on nitrogen utilization (N) from trypticase (15 g/L) after 76 hours of incubation. The figures present data of percentage of utilized nitrogen ( $N-NH_3 + N$ -microbes) (■), N utilized in ammonia production (▲) and in microbial growth (●) (a,b), and  $N-NH_3/N$ -microbes ratio (◆) (c,d). Each point is the average of three observations.

microrganismos que fermentam celulose e hemicelulose utilizam somente a amônia como fonte de nitrogênio para síntese de proteína microbiana, enquanto aqueles que fermentam carboidratos não-estruturais (amido, pectina e açúcares) utilizam amônia e peptídeos como fontes de nitrogênio. Os dados apresentados corroboram estas afirmativas, ou seja, o crescimento microbiano ocorre principalmente pelo uso de peptídeos em baixo pH ruminal, devido à falta de disponibilidade de amônia, e ao uso de amônia em alto pH.

## Conclusões

O pH foi um potente inibidor da atividade fermentativa da proteína no rúmen, no qual reduções inibiu concomitantemente a produção de amônia, sem, contudo, alterar o crescimento microbiano. Este efeito é de grande importância prática, pois justifica o uso de maiores quantidades de proteína degradável nas rações de ruminantes, quando se utilizam maiores quantidades de carboidratos fermentecíveis. Neste

caso, o abaixamento do pH protege os aminoácidos dietéticos contra a fermentação excessiva, aumentando a disponibilidade dos mesmos para o crescimento microbiano ou aumentando o fluxo para o intestino delgado.

### Referências Bibliográficas

- ANNISON, E.F. 1956. Nitrogen metabolism in the sheep. *Biochem. J.*, 64:705-714.
- BARTLE, S.J., PRESTON, R.L., GIBSON, M.L. 1986. In vitro evaluation of the pH effect on protein degradation and synthesis by rumen microorganisms. *Nutrition Reports International*, 34(6):1001-1009.
- CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.*, 8:130-132.
- CHEN, G., RUSSELL, J.B. 1988. Fermentation of peptides and amino acids by a monensin-sensitive ruminal peptostreptococcus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2742-2749.
- CUNHA, L.T., LANA, R.P., BORGES, A.C. et al. Monitoramento da produção de amônia in vitro na determinação da degradação de diferentes fontes de alimento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre, RS. *Anais...*Porto Alegre: SBZ, 1999. p.268.
- ERFLE, J.D., BOILA, R.J., TEATHER, R.M. et al. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.*, 65:1457-1464.
- FOX, D.G., SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, J.D. et al. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. *J. Anim. Sci.*, 70:3578-3596.
- LANA, R.P., RUSSELL, J.B., AMBURGH, M.E.V. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.*, 76:2190-2196.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- MINITAB. 1994. *Minitab®Reference Manual*, PC Version, Release 10.1. Minitab Inc., State College, PA.
- NOCEK, J., RUSSELL, J.B. 1988. Protein and carbohydrate as an integrated system. Relationship of ruminal availability to microbial contribution and milk production. *J. Dairy Sci.*, 71:2070-2107.
- NOLAN, J.V., NORTON, B.W., LENG, R.A. 1976. Further studies of the dynamics of nitrogen metabolism in sheep. *Br. J. Nut.*, 35:127-147.
- RAAB, L., CAFANTARIS, B., JILG, T. et al. 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. *Br. J. Nut.*, 50:569-562.
- RUSSELL, J.B. A re-examination of the amino acid sparing effect of ionophores. In: GRAZING LIVESTOCK NUTRITION CONFERENCE, 1991, Cornell. *Proceedings...*Cornell University: USDA-ARS and Department of Microbiology, 1991. p.101-107.
- RUSSELL, J.B., O'CONNOR, J.D., FOX, D.G. et al. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.*, 70: 3551-3561.
- SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, J.D., VAN SOEST, P.J. et al. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.*, 70:3562-3577.
- YECK, R.G., SMITH, L.W., CALVERT, C.C. Recovery of nutrients from animal wastes. An overview of existing options and potentials for use in feed. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM LIVESTOCK WASTES, 3, 1975, St. Joseph. *Proceedings...* St. Joseph: Am. Soc. Agric. Engineers, 1975. p.193-194.

**Recebido em:** 10/12/99

**Aceito em:** 17/04/00