

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**COMBINACIÓN DE RACIÓN TOTALMENTE MEZCLADA Y PASTURA FRESCA:  
EFECTO SOBRE EL CONSUMO Y METABOLISMO DE NITRÓGENO EN VACAS  
LECHERAS**

**por**

Irene CRUZ  
Pilar OTEGUI  
Valeria OYARVIDE

TESIS DE GRADO presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2015**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS aprobada por:

Presidente de Mesa:

\_\_\_\_\_  
DMTV, MSc. Sebastián Brambillasca

Segundo Miembro (Tutor):

\_\_\_\_\_  
DMTV. Maximiliano Pastorini

Tercer Miembro:

\_\_\_\_\_  
DMTV, MSc. Álvaro Santana

Co-tutor:

\_\_\_\_\_  
DMTV. PhD. Cecilia Cajarville

\_\_\_\_\_  
DCV, MSc. Nicolle Pomiés

Fecha:

Autores:

\_\_\_\_\_  
Irene CRUZ

\_\_\_\_\_  
Pilar OTEGUI

\_\_\_\_\_  
Valeria OYARVIE

## **Agradecimientos**

A nuestros tutores, Maximiliano y Nicolle por su paciencia y apoyo en el camino recorrido de esta etapa, brindándonos siempre su contención.

A Cecilia, Joselo, Germán, Alejandro y al resto de los integrantes de la Cátedra de Nutrición y Producción de Bovinos, por la ayuda brindada durante el período experimental y de análisis en el laboratorio.

A Isabel, Adriana, Matías, Sebastián que en determinados momentos nos dieron una mano durante el período experimental.

Nuestros compañeros de tesis con quienes compartimos los meses de trabajo y sin el trabajo en equipo no se hubiera podido llevar a cabo.

A nuestros compañeros y amigos de Facultad.

A nuestras amigas/os de la vida que en momentos difíciles supieron contenernos con una cerveza bien fría.

A nuestros novios que supieron bancarnos la cabeza.

Y a nuestros padres, hermanos/as y familia, que supieron ayudarnos y apoyarnos desde el inicio y que siempre lo harán.

## Tabla de Contenidos

	Pág.
<b>PÁGINA DE APROBACIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>3</b>
<b>Lista de Cuadros y Figuras.....</b>	<b>5</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Resumen.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Summary.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Introducción.....</b>	<b>9</b>
<b>4. Revisión Bibliográfica.....</b>	<b>10</b>
4.1. Sistema de producción lechera en Uruguay.....	10
4.2. Características de las pasturas .....	10
4.3. Digestión Ruminal .....	12
4.4. Digestión y Metabolismo del Nitrógeno.....	13
4.5. RTM en la alimentación en vacas lecheras.....	17
4.6. Efecto de combinar pasturas y RTM en dietas de vacas lecheras.....	18
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>21</b>
<b>6. Objetivos.....</b>	<b>21</b>
6.1. Objetivo General.....	21
6.2. Objetivos específicos.....	21
<b>7. Materiales y Métodos.....</b>	<b>21</b>
7.1. Diseño Experimental.....	22
7.2. Manejo de los animales y alimentación.....	22
<b>8. Determinaciones y Técnicas.....</b>	<b>24</b>
8.1. Consumo de materia seca y Nitrógeno.....	24
8.2. Urea en sangre y leche.....	24
8.3. Nitrógeno en leche.....	25
8.4. Nitrógeno en heces y orina.....	25
8.5. Balance de Nitrógeno.....	25
8.6. Composición química de los alimentos.....	25
8.7. Análisis estadístico.....	26
<b>9. Resultados.....</b>	<b>27</b>
<b>10. Discusión.....</b>	<b>30</b>
<b>11. Conclusión.....</b>	<b>35</b>
<b>12. Bibliografía.....</b>	<b>36</b>

## Lista de Cuadros y Figuras

	Pág
<b>Cuadro I.</b> Composición química <sup>1</sup> del forraje fresco ( <i>Lolium multiflorum</i> ), la ración totalmente mezclada (RTM) y de los alimentos utilizados para formular la RTM.....	23
<b>Cuadro II.</b> Ingredientes de la ración totalmente mezclada (RTM).....	24
<b>Cuadro III.</b> Consumo de Materia Seca y Nitrógeno, partición y balance de Nitrógeno en vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes combinaciones de ración totalmente mezclada y forraje fresco.....	27
<b>Cuadro IV.</b> Concentración de urea en sangre y en leche en vacas Holando de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de ración totalmente mezclada y forraje fresco.....	28
<b>Gráfico I.</b> Evolución de la concentración de urea en sangre por hora en vacas Holando alimentadas con diferentes proporciones de ración totalmente mezclada y forraje fresco.....	28

## Lista de Abreviaturas

**FF:** Forraje Fresco

**RTM:** Ración totalmente mezclada

**RTM 100:** RTM ad libitum.

**RTM50:** 50 % del consumo estimado de RTM + forraje fresco de alta calidad.

**RTM75:** 75 % del consumo estimado de RTM + forraje fresco de alta calidad.

**N:** Nitrógeno

**MS:** Materia Seca

**NNP:** N No Proteico

**aá:** Aminoácidos

**PC:** Proteína Cruda

**NH<sub>3</sub>:** Amoníaco

**PB:** Proteína Bruta

**FND:** Fibra Neutro Detergente

**AGV:** Ácidos Grasos Volátiles

**CH<sub>4</sub>:** Metano

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono

**PM:** Proteína Microbiana

**MO:** Materia Orgánica

**AAE:** Aminoácidos Esenciales

**MUN:** N ureico en leche

**BUN:** N ureico en sangre

**PUN:** N ureico en plasma

**PV:** Peso Vivo

**FDAi:** Fibra Detergente Ácido indigestible

**ENL:** Energía Neta de Lactación

## 1- Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco (FF) de alta calidad y una ración totalmente mezclada (RTM) sobre el metabolismo del nitrógeno (N) en vacas lecheras de alta producción. Se utilizaron 12 vacas Holando,  $523 \pm 88$  kg de PV, multíparas, en lactación con una producción en la lactancia previa de  $7908 \pm 719$  kg de leche. Se utilizó un diseño experimental de cuadrados latinos 3x3 por cuadruplicado, en los cuales se asignó tres tipos de dietas basadas en combinaciones de RTM y FF, y fueron: RTM100: oferta *ad libitum* de una RTM; RTM75: dieta compuesta en materia seca (MS) por una oferta equivalente al 75% de RTM (de la misma RTM utilizada en RTM100) + una oferta equivalente al 25% de FF; y RTM50: dieta compuesta en MS por una oferta equivalente al 50% RTM (de la misma RTM utilizada en RTM100) + una oferta equivalente al 50% FF. El forraje fresco se obtuvo de una pastura de raigrás anual (*Lolium multiflorum*). Se determinó el consumo individual diario de alimentos (RTM y FF) y consumo de N. Se tomaron muestras de leche y sangre donde posteriormente se determinó el contenido de urea. Se colectaron muestras puntuales de orina y heces para determinar la concentración de N, utilizando el método de Kjeldhal y se calculó el balance de N y la eficiencia de uso del N digestible. Se observó que la eficiencia de utilización de N digestible, fue mayor en el tratamiento RTM50 (31,6 %). Se concluye que la inclusión de FF de alta calidad en dietas a base de RTM, influyó positivamente aumentando la eficiencia de utilización del mismo contrariamente a lo esperado.

## 2- Summary

This study main objective was to evaluate the effect of providing different combinations of high quality fresh forage (FF) and total mixed ration (RTM) on the metabolism of Nitrogen (N) in high producing dairy cows. Twelve multiparous lactating Holstein cows were selected. The experimental design was a Latin square 3 x 3 quadruplicated in which three types of diets were designed based on combinations of RTM and FF. This combinations were: RTM100: offered *ad libitum*; RTM75: 75% of RTM (the same RTM used in RTM100) + 25% of FF; and RTM50: 50% of RTM (the same RTM used in RTM100) + 50% of FF. The pasture used was annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) in a growth stage. Individual diary intake of RTM and FF was determined and based on the analysis of the composition of the food, nitrogen intake was calculated. Milk samples were taken to determined urea content, and at the same time spot samples of urine and feces were taken. The nitrogen concentration of urine and feces were determined by Kjeldhal method. Nitrogen balance was calculated as the difference between total nitrogen consumed and nitrogen excreted in feces, urine and milk. For the nitrogen utilization efficiency the most efficient treatment was RTM50 with a 31,6% so it is concluded that the inclusion of diets based on high quality forage influenced nitrogen metabolism but not as expected, due to the background and characteristics of the RTM, it was expected RTM100-RTM75 diets to be greater utilization efficiency and who influenced on N metabolism.



### 3- Introducción

En la mayoría de los sistemas de producción de leche del Uruguay la pastura es el componente principal de la base alimenticia. Muchos sistemas de producción intensiva de rumiantes se apoyan en el uso de pasturas de alta calidad, estas son variedades de gramíneas y leguminosas, sembradas solas o asociadas (Chilibroste, 2002). Estos tipos de forrajes son desbalanceados en cuanto al aporte de energía y N para los microorganismos ruminales. Para que la capacidad potencial de degradación de la población microbiana se pueda expresar, se necesita tanto de fuentes adecuadas de energía y N para los microorganismos del rumen como de condiciones adecuadas del medio ambiente ruminal (Chilibroste, 1998).

Existen muchas alternativas para mejorar el balance de nutrientes de la dieta de rumiantes y una de ellas que está siendo utilizada en diversos países, incluyendo a Uruguay, consiste en la mezcla de forrajes conservados y concentrados en un solo y completo alimento (Spahr y Harshbarger, 1971). Este sistema se le llama ración totalmente mezclada (RTM), alimento completo o ración completa (Coppock y col., 1981), y se refiere al mezclado de todos los ingredientes de la dieta, formulada con concentraciones específicas de nutrientes. Posee varias ventajas, como evitar la selección de los ingredientes y permite una alta producción, sin embargo, tiene desventajas, como el necesitar de un mixer el cual es costoso, lo que no es económicamente rentable el uso de RTM en rodeos pequeños, (Coppock, 1977).

El exceso de proteína en relación a la energía disponible en el rumen conducen a una baja eficiencia de utilización del N por los microorganismos ruminales y aumentos en la excreción de N, y esta detoxificación obligada es un proceso consumidor de energía, lo que afecta el balance energético del animal (Chilibroste, 1998). Suplementando la dieta de vacas lecheras en pastoreo con alimento bajo en proteína y alto en energía, aumenta la eficiencia de utilización de N, principalmente porque se disminuye la ingesta de este. La manera más fácil de reducir el consumo de N es reemplazar parte de la pastura rica en N por forrajes o concentrados con bajo contenido en proteínas (Van Vuuren y col., 1993). Sin embargo en dietas con alta cantidad de proteína tiende a ser mayor el consumo de materia seca (MS) que en dietas de baja proteína (Spek y col., 2013).

El balance de N, se determina como la diferencia entre el N consumido con los alimentos, y el eliminado en heces, orina y cualquier otro producto que contenga N, por ejemplo leche, (McDonald, y col. 2006). En este trabajo se evalúa el efecto de incluir diferentes cantidades de forraje fresco en la dieta de vacas Holando de alta producción, en el consumo de N y metabolismo del N.

## 4- Revisión bibliográfica

### 4.1- Sistema de producción lechera en Uruguay:

Durante el año 2012 la producción total de leche en el país fue de 2.249 millones de litros, representando un incremento del 4.8% respecto al 2011 y del 62% en la última década, constituyendo un destacado ejemplo del incremento productivo. Sin embargo el número de productores lecheros, volvió a registrar un descenso por tercer año consecutivo (2.9%), alcanzando la reducción a un 12% en el transcurso de la última década. Similar comportamiento muestra la superficie total manejada por estos establecimientos, que cae 3.8% en relación al ejercicio anterior y un 12% respecto al 2003. Aun así hay un crecimiento sostenido en el tamaño de los establecimientos lecheros cuando se mide por el número de vacas que se ordeñan (DIEA, 2013).

Este aumento de la productividad tiene origen la intensificación mediante algunos cambios técnicos (DIEA, 2013). Este proceso de intensificación tiene relación con la alimentación de los animales. Los productores lecheros manejan la alimentación de sus animales distintas maneras. Una es suministrándoles una dieta en forma de RTM encerrando los animales en forma permanente, o manejando en forma separada el pastoreo directo, los concentrados y las reservas forrajeras. Existen producciones donde los animales están bajo pastoreo pero el resto de los alimentos (ensilajes, henos, concentrados) se suministran en forma de RTM (Cajarville y col., 2012).

En los sistemas no pastoriles de producción de leche, la manipulación de la cantidad y tipo de nutrientes disponibles para el rumiante, se realiza a través de cambios en el nivel y tipo de suplemento utilizado. En cambio en los sistemas pastoriles, donde la pastura es el componente principal de la alimentación, la manipulación de la cantidad y tipo de nutrientes disponibles para el rumiante se basa en el control del proceso de pastoreo. Controlar el pastoreo, aparece como la vía tecnológica con mayor potencial para lograr cambios en la cantidad y calidad del producto obtenido sin variar en forma significativa los costos de producción. Históricamente la base del sistema de producción de leche en Uruguay era esencialmente pastoril (>70% de la dieta) (Chilibroste, 2002), sin embargo en estos últimos años la dieta de los sistemas lecheros, al menos en el estrato de tambos más grandes con mayor cantidad de animales y superficie, está compuesta por un 56% de reservas forrajeras y concentrados (Cajarville y col., 2012).

### 4.2- Características de las pasturas:

Las pasturas son esenciales para el buen funcionamiento de los sistemas de producción pastoriles, ya que los ruminantes dependen de los mismos para mantener su salud, además de permitir una producción de manera rentable y sostenible. Las pasturas no son solo una fuente económica de nutrientes para la producción animal, sino que también ayudan a conservar la integridad del suelo, suministro de agua y calidad del aire, contribuyendo tanto con el medio ambiente como con el bienestar animal (Chaudry, 2008).

El mayor aporte de nutrientes de los forrajes es proporcionado por los polisacáridos, unidos por enlaces  $\beta$ 1-4 (Chilibroste, 2002). Los carbohidratos de la pastura se pueden clasificar en 5 fracciones: carbohidratos solubles en agua, pectinas, hemicelulosa (10-40%), celulosa (20-40%) y lignina (5-10%) (Curso nutrición 2013). Sus proporciones relativas varían con la especie de forraje, estación del año y fertilización, entre otros factores (Beever y Siddons, 1986). Otros de los contribuyentes importantes de los forrajes son las proteínas, lípidos, minerales y vitaminas (Chilibroste, 2002).

La cantidad de materias nitrogenadas en un alimento se expresa como proteína bruta ( $PB = N \text{ total} * 6.25$ ), estas materias nitrogenadas se pueden clasificar en proteína verdadera y N no proteico (NNP). El NNP puede representar en las pasturas templadas de buena calidad de 15 a 25 % del N total y comprende péptidos, aminoácidos (aá), aminos, amidas y nitratos (Mangan, 1982). La proteína verdadera se divide en tres grandes grupos: a) proteína soluble (50%) constituida fundamentalmente por ribulosa bifosfato carboxilasa y proteínas del cloroplasto y citoplasma, b) proteínas insolubles (43 %) asociadas a lípidos de las membranas y pigmentos y c) otras fracciones (7%) como enzimas mitocondriales y extensinas de la pared celular (Chilibroste, 1998).

En regiones con una industria lechera intensiva se requieren grandes cantidades de pasturas de alta calidad (Van Vuuren y *col.*, 1993), como lo son las gramíneas y leguminosas, sembradas solas o asociadas (Chilibroste, 1998) y con una alta fertilización nitrogenada (Van Vuuren y *col.*, 1993), lo que genera una disminución en el contenido de MS y un aumento en el de proteína cruda (PC) (Van Vuuren y *col.*, 1991), es decir son desbalanceados en el suministro de energía y N (Chilibroste, 1998). Las especies más utilizadas en los sistemas pastoriles son, trébol blanco y rojo, alfalfa y lotus como leguminosas; festuca, dactylis, avena, raigras, sorgo, trigo y cebada como gramíneas (Manual Pasturas). Además, las fracciones de nitrógeno de este tipo de pastura son degradados rápida y extensamente en el rumen, produciendo amoníaco ( $NH_3$ ) (Cajarville, y *col.*, 2007).

Las gramíneas en estado vegetativo presentan una composición característica con un alto valor nutritivo: 18% de MS, 19% de proteína bruta (PB), 40% de fibra neutro detergente (FND) y entre un 6 y un 10 % de azúcares en base seca, dependiendo fundamentalmente de la época del año y del momento del día (Cajarville, y *col.*, 2007). Sin embargo, consumiendo exclusivamente estas pasturas, tanto el consumo de MS como el consumo de nutrientes, y particularmente el consumo de energía, que las vacas pueden alcanzar es menor respecto a cuando son alimentadas con RTM, y en consecuencia, el potencial de producción no se manifiesta en su máxima expresión (Kolver, 2003).

Existen varias teorías de como el consumo está regulado por la integración de factores internos y externos del animal. Cada teoría podría ser aplicable en algunas condiciones, pero lo más probable es que sea el efecto aditivo de varios de estos estímulos en lo que se conoce como teoría del mínimo desconfort (Forbes, 1996).

Los principales parámetros que influyen en el consumo se dividen en factores inherentes al animal (raza, sexo, genotipo y peso vivo), factores propios del alimento (composición, digestibilidad, palatabilidad, contenido en MS), factores relacionados al manejo y del ambiente en el cual estos se desarrollan (temperatura, humedad, tiempo de acceso al alimento, frecuencia de alimentación, disponibilidad de espacio) (Forbes, 1996), siendo el contenido de FDN y su digestibilidad los principales factores reguladores del consumo inherente a los alimentos en dietas para vacas lecheras en producción (NRC, 2001).

#### 4.3- Digestión Ruminal:

Los rumiantes han desarrollado un sistema digestivo especial, el retículo-rumen, que supone la fermentación microbiana de los alimentos mediante bacterias anaerobias y protozoos, así como algunos hongos, dando lugar principalmente a ácidos grasos volátiles (AGV), células microbianas, y los gases metano ( $\text{CH}_4$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). El rumen es un sistema de fermentación continua, por lo que necesita de una serie de mecanismos homeostáticos, los ácidos producidos durante la fermentación podrían, hacer descender el pH del líquido ruminal hasta 2,5-3,0; sin embargo, en condiciones normales, el pH se mantiene entre 5,5 y 6,5. Los fosfatos y bicarbonatos de la saliva actúan como tampones, además que la rápida absorción de los ácidos y su pasaje (así como el  $\text{NH}_3$ ) facilitan el mantenimiento del pH en el medio ruminal (McDonald y col., 1999).

Los principales AGV son acetato, propionato y butirato, y ellos aportan la mayor parte de las necesidades energéticas del animal. Los gases se eliminan por eructación, y los AGV se absorben, en su mayor parte a través de la pared ruminal. Las células microbianas, pasan al abomaso e intestino delgado, acompañando a los componentes de los alimentos no degradados; allí son digeridas por las enzimas segregadas, absorbiéndose los productos de la digestión. En el intestino grueso existe una segunda fase de digestión microbiana. Los AGV producidos en el intestino grueso también se absorben, pero las células microbianas se excretan con los componentes no digeridos de los alimentos por las heces (McDonald y col., 1999; Cunningham y Klein, 2009).

El proceso digestivo en el rumen o en el colon implica la interrelación entre las numerosas especies de bacterias y otros microorganismos, lo que hace que el ecosistema de la digestión fermentativa sea muy complejo, ya que los productos de desechos de una especie microbiana proporcionan sustrato para otra (Cunningham y Klein, 2009).

Se han identificado más de 60 especies de la población bacteriana total. La población relativa de cada especie en particular varía con el sustrato, pueden ser gramnegativas (como las que fermentan forrajes) o grampositivas (principalmente las que desdoblan granos como los lactobacilos). Las bacterias se clasifican según el tipo de sustrato sobre el que actúan. De este modo, se dividen en celulolíticas, hemicelulolíticas, amilolíticas, sacarolíticas, utilizadoras

de ácido, proteolíticas, lipolíticas, hidrogenantes, entre otras (McDonald y col., 1999; Shimada, 2003).

Según el tipo de hidrato de carbono predominante en la dieta, se condicionará el desarrollo de la micorbiota adecuada para su fermentación y el ajuste del pH a su rango ideal. De manera que, una ración rica en almidón es fermentada por una microbiota amilolítica que se desarrolla mejor a un pH de 5,5 a 6,0, mientras que, una ración compuesta por forraje con alto contenido de hidratos de carbono estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas) será fermentada por una microbiota celulolítica que se desarrolla mejor a un pH de 6 a 6,9 (Relling y Mattioli, 2003).

#### 4.4- Digestión y Metabolismo de Nitrógeno:

Los sistemas de alimentación de vaca lechera más recientes como el NRC, 2001 establecen la proteína metabolizable (PMet) como la porción de materias nitrogenadas que puede ser utilizada por el rumiante y que se compone de tres fracciones bien definidas: a) las materias nitrogenadas del alimento no degradadas en rumen pero potencialmente digestibles, la proteína contenida en los microorganismos ruminales que trascurren con la digesta al tracto posterior del aparato digestivo y el N endógeno constituido por células de descamación, secreciones y otros componentes propios del animal.

Las proteínas de los alimentos son hidrolizadas por los microorganismos del rumen, hasta péptidos y aminoácidos, algunos de los cuales pueden degradarse hasta ácidos orgánicos, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> (McDonald y col., 1999). Este NH<sub>3</sub> proviene además, de la hidrólisis de urea reciclada y de la degradación de PM. El NH<sub>3</sub> desaparece de las reservas ruminales mediante su captación por los microorganismos, se absorbe a través de la pared del rumen y al pasar hacia el omaso (Church, 1993), va a la sangre, llega al hígado y se convierte en urea mediante la detoxificación. Parte de esta urea puede regresar al rumen con la saliva o, directamente, a través de la pared ruminal, pero la mayor parte se excreta por orina, y por tanto, se pierde, (Elrod y Butler, 1993; McDonald y col., 2006).

El metabolismo del N en el rumen se divide en 2 etapas distintas: 1) la degradación de la proteína, que proporciona la fuente de N para las bacterias, y 2) la síntesis de proteína microbiana (PM). La velocidad y extensión a la que se produce la degradación de la proteína dependerá de la actividad proteolítica de la microbiota ruminal, del tipo de proteína (susceptibilidad y accesibilidad de los enlaces peptídicos), del pH ruminal (la actividad proteolítica ruminal disminuye cuando el pH disminuye), del sustrato que se está fermentando (principalmente carbohidratos dentro del mismo pienso y dentro de los contenidos del rumen), y de la especie predominante de la microbiota ruminal (que depende a su vez del tipo de ración, de la tasa de pasaje ruminal ya que la degradación de las proteínas es inversamente proporcional a la tasa de pasaje a través del rumen, y del pH ruminal) (Bach y col., 2005).

Los ruminantes poseen la capacidad única de subsistir y producir sin disponer de una fuente de proteína dietética, pueden producir leche cuando la dieta

solamente contiene NNP como fuente de N, debido a la síntesis de PM en el interior del rumen (Church, 1993).

En cuanto a la síntesis de PM, la fuente de N que utilizan los microorganismos, consiste tanto en péptidos sencillos, aá libres,  $\text{NH}_3$  y NNP, provenientes de los alimentos que son degradados en el rumen, así como también del N ureico reciclado, que va hacia el rumen para su reutilización, ingresando por vía sanguínea o saliva (Church, 1993; McDonald y *col.*, 2006; Repetto y Cajarville, 2009). La PM fluye hacia el omaso, abomaso y posteriormente hacia el intestino delgado para su digestión, junto con el resto de la digesta (Church, 1993).

La eficiencia de síntesis de PM, se refiere a la cantidad de microorganismos generados por unidad de alimento, y se expresa de diferentes maneras: masa microbiana (o N microbiano) en función de la MS ingerida, o de la materia orgánica (MO) ingerida, o, lo más habitual, de la MO digerida o fermentada en el rumen (Repetto y Cajarville, 2009).

Mejorar la eficiencia de síntesis de PM puede ser beneficioso para aumentar el aporte de aminoácidos esenciales (AAE), a un costo relativamente más bajo que por aumento de suplementos de PC en la dieta. Es importante maximizar el crecimiento bacteriano para lograr una mayor eficiencia de utilización de nutrientes que se suministran al animal y para aumentar el flujo de PC bacteriana al duodeno (Mabjeesh y *col.*, 1997).

El  $\text{N-NH}_3$  en rumen que no está incorporado al N microbiano es la fuente principal de pérdida de N en la orina (Van Vuuren, 1993). La orina contiene productos del metabolismo del N, es la principal ruta de excreción para la mayoría de los productos residuales, siendo la urea el principal producto final del metabolismo del N (Broderick y Clayton, 1997). La cantidad de urea excretada por los rumiantes, así como también la proporción de N urinario total excretado en forma de urea, han demostrado estar correlacionados positivamente con la ingestión de N digestible (Church, 1993).

El N excretado en heces por vacas lecheras como producto final del metabolismo del N, parece ser bastante constante en proporción al consumo de MS, (Castillo y *col.*, 2000), resulta de la excreción de la fracción de N indigestible del alimento, microbiano y del N endógeno (Tamminga, 1992; Kauffman y St-Pierre, 2001).

El  $\text{NH}_3$  absorbido y transformado en urea en el hígado, pasa a la sangre siendo éste la fuente principal de urea en leche. El N ureico en leche (MUN) es derivado principalmente del N ureico en sangre (BUN) porque la urea se equilibra rápidamente por los fluidos corporales, incluyendo leche (DePeters y Ferguson, 1992; Broderick y Clayton, 1997), la excreción de urea por orina es proporcional a la concentración de BUN (Jonker y *col.*, 1998).

El BUN está influenciado positivamente por la ingesta de proteína degradable e indegradable, y negativamente por la ingesta de energía, ya que un aumento del consumo de energía, reduce tanto el  $\text{N-NH}_3$  en rumen como el MUN (DePeters y Ferguson, 1992). El MUN puede ser una herramienta útil para

predecir la excreción de N ureico en orina, la eficiencia de utilización del N en vacas lecheras lactando, y de las emisiones de NH<sub>3</sub> a través del estiércol del ganado lechero, debido a que existe una fuerte relación entre la excreción de N ureico en orina y emisiones de NH<sub>3</sub> (Oltner y *col.*, 1985, Broderick y Clayton, 1997; Burgos y *col.*, 2007).

Uno de los principales problemas en vacas a pastoreo, en pasturas manejadas intensivamente, es la reducida eficiencia de utilización del N, de 15 a 25% (Van Vuuren, 1993; Gehman y *col.*, 2006; Cajarville y *col.*, 2012). Dicho problema se puede superar con un mayor uso de suplementos proteicos, pero son los ingredientes más costosos, generalmente más caros que los carbohidratos (Nocek y Rusell, 1988).

Una menor eficiencia de utilización de N ha sido atribuida a una captura ineficiente de N ruminal como PM, y al costo metabólico de sintetizar y excretar urea adicional (Kolver y Muller, 1998). Excesos de proteína en relación a la energía disponible en rumen conducen a una baja eficiencia de utilización del N por los microorganismos ruminales, y aumentos en la excreción de N urinario en forma de urea. Esta detoxificación requiere un aporte de energía en forma de ATP, afectando el balance energético del animal (Chilibroste, 1998). El costo de la excreción de esa urea es de 1,8 kg de leche/día (Kolver y Muller, 1998) es decir que aumentan los requerimientos de energía (13,3 Kcal de energía digestible/g de N en exceso) resultando en altos costos de alimentación por lo tanto alimentar vacas con más proteína de las que necesita es innecesario y se estaría derrochando dicha proteína en exceso (Broderick y Clayton, 1997).

Es posible aumentar sustancialmente la utilización de N por parte de los bovinos, a través de la realización de cambios en la composición de la dieta (Jonker y *col.*, 1998). La adaptación del contenido de proteína de forraje a las necesidades de los animales es una primera e importante estrategia para mejorar la eficiencia de utilización de N por los bovinos (Hoekstra y *col.*, 2007). Suplementando la dieta de vacas lecheras en pastoreo con alimento bajo en proteína y alto en energía, aumenta la eficiencia de utilización de N, principalmente porque se disminuye la ingesta de este. La manera más fácil de reducir el consumo de N es reemplazar parte de la pastura rica en N por forrajes o concentrados con bajo contenido en proteínas (Van Vuuren, 1993). Sin embargo en dietas con alta proteína tendería a ser mayor el consumo de MS que en dietas de baja proteína (Spek y *col.*, 2013).

Los requerimientos proteicos se calculan considerando el mantenimiento, crecimiento, gestación y lactación; se ha establecido un mínimo de 14% de PB en todas las raciones para garantizar el funcionamiento ruminal (NRC, 2001; Casamiglia y *col.*, 2009). En vacas en período de lactación el requerimiento se basa en el contenido de proteína secretada por leche, se estima un 16% de PC donde el límite inferior es de 14% y el superior es de 21% (NRC, 2001), sin embargo Broderick (2003) comparó una dieta de 18% de PC con una de 16% de PC y observó que una dieta con una concentración de PC de 16,7% se mantiene la producción de leche y la composición de la misma, además disminuye la urea en leche y la excreción urinaria de N. Como regla general,

las vacas lecheras no deben ser alimentadas por encima de sus necesidades de proteína, limitando la excreción innecesaria de N en las heces, y maximizando el contenido de proteína en la leche (Tamminga, 1992).

Del mismo modo, al disminuir la concentración de PC en la dieta a un 16-17%, se podría reducir la producción de  $\text{NH}_3$  en un 20% (Kebreab y col., 2002). Por otro lado, una deficiencia de  $\text{NH}_3$  en el rumen limita la actividad microbiana, la síntesis de PM y la tasa de la digestión que, a su vez, reduce el consumo de pienso y de energía (Church, 1993).

En vacas de alta producción, el aporte solo de PM es insuficiente. Hay una fracción de la proteína digestible de la dieta que escapa a la degradación en el rumen y suplementa a la PM aportada por animal. Por lo tanto para aumentar el nivel de producción se puede incrementar la cantidad de proteína de la dieta que escapa del rumen (proteína indegradable en rumen) y estimular la producción de proteína microbiana (Church, 1993). Al disminuir la degradación de la proteína en el rumen, las pérdidas de N se reducen, porque se mejora la eficiencia de captura del N degradado en rumen a través de la síntesis de PM y/o porque se reduce el nivel de N dietético (Tamminga, 1992; Bach y col., 2005), pero la desventaja de la reducción en el contenido de N de la dieta, es que puede disminuir la digestión de otros ingredientes de la misma (Tamminga, 1992).

A mayor cantidad de proteína degradable en rumen, más N se absorbería como  $\text{NH}_3$ , lo que podría aumentar la excreción de N en orina (Castillo y col., 2001; Kebreab y col., 2002). Por lo tanto el disminuir la degradabilidad de la proteína afecta la liberación de N en el rumen y provee N adicional para ser absorbido postruminalmente (Kebreab y col., 2002). La alimentación con proteínas y carbohidratos que no son degradados en el rumen aumenta la cantidad de proteína de la dieta que pasa al intestino delgado, pero puede disminuir la cantidad de PM que es sintetizada en el rumen (Clark y col., 1992). Además, el aumento de la proteína indegradable en rumen, que a menudo resulta en una disminución de la oferta de proteína degradable y en un cambio en el perfil de  $\text{NH}_3$  absorbidos, generalmente no mejora el rendimiento de la lactancia (Castillo y col., 2000).

Otra vía a través de la cual puede ser mejorada la eficiencia de utilización del N por parte de los animales es logrando un equilibrio a través de la sincronización de los carbohidratos y la proteína en el rumen. Esto implica la optimización tanto en cantidades de carbohidratos y proteínas disponibles, así como también en sus respectivas tasas de degradación a nivel ruminal (Hoekstra y col., 2007). En nutrición de rumiantes, la "nutrición sincrónica" se refiere más comúnmente al suministro con la dieta de proteína y energía al rumen, de tal manera que estén disponibles simultáneamente en las proporciones requeridas para ser usados por los microorganismos ruminales. Teóricamente, la disponibilidad de nutrientes sincrónicos debe permitir un uso más eficiente de los nutrientes, mejorando así la producción de productos microbianos aumentando el suministro de nutrientes para el animal, y mejorando potencialmente el rendimiento de la producción (Hall y Huntington, 2008).



Para que la eficacia de la producción animal sea máxima, y la necesidad de proteína íntegra en la dieta sea mínima, es deseable aumentar la producción de PM en el rumen, y que todos los nutrientes precisos para el crecimiento microbiano estén presentes simultáneamente, en las concentraciones apropiadas (Church, 1993). Si no se consigue este balance, el N puede sufrir una degradación rápida y masiva, que puede superar la capacidad de síntesis de los microorganismos del rumen (McDonald y col., 2006). Por lo tanto, para mejorar la eficiencia de vacas pastoreando, tiene que coincidir la tasa de degradación del N de la pastura con la tasa de degradación de los carbohidratos del suplemento (Van Vuuren y col., 1990; Gehman y col., 2006).

Mejorar la utilización de la PC en el retículo rumen reducirá la absorción de  $\text{NH}_3$  por dichos compartimentos y consecuentemente la excreción de N (Van Vuuren y col., 1990). Para que el  $\text{NH}_3$  se incorpore eficientemente a la PM, deben cumplirse 2 condiciones. En primer lugar, la concentración inicial de  $\text{NH}_3$  debe ser inferior a la óptima (de lo contrario, el exceso de  $\text{NH}_3$  se absorbería y perdería) y en segundo lugar, los microorganismos deben disponer, para la síntesis proteica, de alguna fuente energética fácilmente utilizable (McDonald y col., 2006), es decir que, la fermentación de hidratos de carbono es esencial para la incorporación del N- $\text{NH}_3$  a la PM (Coppock, 1977). En algunas ocasiones esta sincronía nutricional de proteínas y energía en el rumen, no ha generado los aumentos previstos en la eficiencia microbiana y la productividad animal (Hall y Huntington, 2008). Es probable que se deba a que en el complejo ecosistema de microorganismos ruminales, cuando se sincroniza el suministro de nutrientes para una subpoblación específica, no se sincroniza para otras poblaciones (Bach y col., 2005).

Otras razones por las cuales es importante considerar la eficiencia de utilización del N es que un consumo excesivo de proteína degradable disminuiría el pH uterino durante la fase lútea, lo que podría reducir la fertilidad (Elrod y Butler, 1993). Además, el  $\text{NH}_3$  y sus metabolitos tienen efectos tóxicos sobre los gametos y embriones (Ferguson y Chalupa, 1989).

El exceso de MUN representa la PC en la dieta que no está siendo utilizada para producción, además, el exceso de N en la dieta, contribuye a través de la excreción en orina y heces (70% del N consumido), a la contaminación medioambiental (DePeters y Ferguson, 1992; Castillo y col., 2000; Ryan, y col. 2011). En los últimos años hay una creciente preocupación con respecto a las emisiones de  $\text{NH}_3$  a la atmósfera y su impacto en el medio ambiente y la salud humana (Burgos y col, 2007). La producción lechera causa pérdidas inevitables en la respiración, heces y en la orina, lo que puede convertirse en una carga ambiental como contribuyentes al efecto "invernadero" ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ) o a la contaminación del aire ( $\text{NH}_3$ ), suelo, superficie y el agua del subsuelo ( $\text{NO}_3$ , P) (Tamminga, 1992).

#### 4.5- RTM en la alimentación en vacas lecheras:

Existe una alternativa que está siendo utilizada por varios productores en la que se mezcla forraje y concentrados en un solo y completo alimento (Spahr y

Harshbarger, 1971). Este sistema se le llama RTM, alimento completo o ración completa (Coppock y col., 1981), y se refiere al mezclado de todos los ingredientes de una dieta de forma cuantitativa, de manera que:

- \* previene la separación y clasificación de los distintos alimentos
  - \* se formula con concentraciones específicas de nutrientes
  - \* se puede ofrecer *ad libitum*
  - \* aumenta la producción de leche
  - \* diluye y enmascara el sabor no palatable de ingredientes como la urea
  - \* aporta una relación óptima de forraje/concentrado previniendo los casos de disminución de grasa en leche, alteraciones digestivas y metabólicas
  - \* evita la alimentación con grano en la sala de ordeño
- (Coppock, 1977; Lammers y col., 2002).

Por el contrario:

- \* se necesita de un mixer el cual es costoso
  - \* submezclar puede resultar en que las vacas utilicen el alimento de manera menos eficiente
  - \* sobremezclar puede causar serios problemas en moler y pulverizar el alimento, ya que esto provoca alteraciones ruminales y el tiempo de pasaje se verá aumentado, disminuyendo la digestibilidad
  - \* no es económicamente rentable en rodeos pequeños
- (Coppock, 1977; Gachuiru y Wahome, 2001; Lammers y col., 2002).

Para que este sistema funcione de forma exitosa, los requerimientos nutricionales de cada categoría deben ser calculados, ya que las raciones se basan en dichos requerimientos. Asimismo es necesario saber la calidad del forraje y las concentraciones de los nutrientes que contiene, y que la MS esté entre el 50-60% para que se cumplan los requerimientos en función al peso y la producción (Gachuiru y Wahome, 2001).

#### 4.6- Efecto de combinar pasturas y RTM en dietas de vacas lecheras:

En la literatura internacional se encuentran diversos experimentos que estudian los 2 sistemas de alimentación, pastura y RTM. Uno de ellos es el realizado por Kolver y Muller (1998), en el que compararon el consumo de nutrientes en vacas lecheras de alta producción alimentadas en base a pastura o RTM, y buscaron identificar qué nutrientes limitan la producción de leche. Si bien hubieron diferencias significativas en el consumo de MS entre las dos dietas (mayor consumo de MS en el tratamiento alimentado con RTM), la pastura utilizada era de alta calidad (25,1% de PC), lo que permitió que las vacas consumieran la misma cantidad de PC por día que las alimentadas con RTM, (19,1 % de PC), el consumo de N en las vacas a pastoreo fue de 784 g/d y en las vacas a RTM fue de 752 g/d, sin embargo la excreción del mismo fue mayor para las vacas a pastoreo, debido a una menor eficiencia de utilización del N. Con respecto al N en leche se observó que en las vacas a pastoreo fue de 120,6 g/d y en vacas a RTM fue de 191,2 g/d. La producción de leche fue mayor en vacas alimentadas con RTM, esto podría deberse al mayor consumo de MS que hubo en este tratamiento.

Bargo, y col., (2002) compararon tres sistemas de alimentación, uno a base de RTM (100%), otro a base de pastura más concentrado (60% pastura, 40% concentrado) y el tercero combinando los dos anteriores (RPM) (30% pastura, 61% RTM y 9% concentrado). El consumo de MS fue mayor en RTM y menor en pastura más concentrado. El porcentaje de PC de la dieta con pastura y concentrado fue de 21,8%, del RPM fue de 19,1% y por último el tratamiento RTM fue de 16,9%, sin embargo el consumo de N no presentó diferencias entre los tratamientos. La producción de leche fue mayor para las alimentadas con RTM y menor para las alimentadas con pastura más concentrado. El contenido de N en leche presentó diferencias entre los tres tratamientos, RTM (177,1 g/d), el de pastura más concentrado (123,8 g/d), y el RPM (145,7 g/d). Con respecto a el MUN se observa que este fue menor para RTM (10.6 mg/dL), intermedio el RPM (12,0 mg/dL) y mayor para pastura con concentrado (14.9 mg/dL). El nivel de urea en plasma fue mayor en el tratamiento pasturas más concentrado (17.2 mg/dL) con respecto a RTM y RPM (13,8 mg/dL).

En un experimento realizado por Soriano y col., (2001), en el que se utilizaron tres dietas, una solo RTM (100RTM) y otras 2 RTM más pastura durante 8hs, la única variable fue la hora en que pastoreaban, una era por la mañana (PAM) y la otra por la tarde (PPM). En este experimento el porcentaje de PC del RTM fue de 18% mientras que el porcentaje de PC de la pastura utilizada fue de 27%. El consumo de MS fue similar para los tres tratamientos, siendo 26,6 kg/d MS. En cada tratamiento se calculó el consumo de N obteniéndose como resultado que el tratamiento 100RTM consumió 752 g/d, PAM 848 g/d y el PPM 894,4 g/d. La producción de leche fue mayor en 100RTM comparado con PAM y PPM. En cuanto al porcentaje de proteína en leche no hubo diferencias significativas. Se realizó el cálculo de N en leche y se observó que tampoco hubo diferencias.

Vibart y col. (2008), realizaron dos trabajos donde se asignaron a los animales distintos porcentajes de RTM y pasturas (100% RTM; 79% RTM y 21% pastura, 68% RTM y 32% pastura, 59% RTM y 41% pastura en el experimento 1 en otoño, en el segundo trabajo se dieron las siguientes proporciones 100% RTM; 89% RTM y 11% pastura; 79% RTM y 21% pastura; 65% RTM y 35% pastura, en primavera). En el primer trabajo, el consumo de N para la dieta 100RTM fue de 656 g/d, para la dieta 79:21 fue de 608 g/d, para la 68:32 de 640 g/d y para la 59:41 de 656 g/d. El porcentaje de proteína en leche, fue mayor para vacas en el tratamiento 68:32 (3,12%), y menor para las vacas en el tratamiento 59:41(2,84%). No hubo diferencias tanto para la producción de proteína en leche como para el N excretado en leche. En lo que respecta al MUN, a mayor contenido de pastura en la dieta, mayor fue en contenido de MUN.

En el segundo trabajo (primavera), el consumo de N para el tratamiento 100RTM fue de 640 g/d, para el 89:11 de 512 g/d, para el tratamiento 79:21 fue de 496 g/d mientras que para la dieta 65:35 el consumo de N fue de 480 g/d presentando una clara diferencia entre las dietas que consumen pasturas con respecto a la dieta basada solo en RTM. El contenido de N en leche fue menor en los tratamientos con mayor nivel de inclusión de pastura. Tanto el MUN como el PUN, disminuyen cuando aumenta el contenido de pastura en la dieta de los tratamientos.

A nivel nacional se han realizado diversos trabajos, Sprunk, y col., (2012a) estudiaron el efecto de diferentes asignaciones de forraje sobre la producción de leche, para lo cual utilizaron tres tratamientos a base del mismo forraje (pradera de segundo año) con diferentes contenidos de MS, uno de asignación alta, uno de asignación media y uno de asignación baja, y en los tres casos se administró 8.5 kg de MS de RTM. Estos autores encontraron diferencias en el contenido de N en leche, donde la asignación media tuvo el mayor contenido con 132,6 g/d, seguido de la alta con 128,5 g/d y por último la de baja con 112,5 g/d. Para producción de leche los grupos de asignación alta y media lograron mayores producciones que el grupo de asignación baja.

Sprunk, y col., (2012b) también estudiaron el efecto de la alimentación al inicio de la lactancia, sobre la producción, con diferentes dietas, en primavera. Los tratamientos utilizados fueron, por un lado, RTM *ad libitum*, y por otro, pastura (pradera de segundo año) más suplementación. Los autores observaron diferencias entre los tratamientos, si bien el consumo de MS de RTM fue mayor que en el de pastura más suplementación, el consumo de N fue mayor en la pastura más suplementación (914 g/d) que en RTM (812 g/d). En cuanto a la producción de leche, el contenido de grasa y proteína en leche fue mayor en la dieta a base de RTM, al igual que el contenido de N en leche, que fue de 156 g/d en las que consumieron RTM y 142 g/d en las que consumieron pastura más concentrado.

Mendoza, y col. (2012abcd), estudiaron el efecto que tiene el acceso a FF en vacas lecheras alimentadas con RTM, sobre diferentes parámetros del animal. Se establecieron tres tratamientos en base a las horas de acceso al FF, RTM0 sin acceso a FF, RTM4 con 4hs de acceso y RTM8 con 8hs de acceso. El consumo de FF aumentó junto con las horas de acceso al mismo mientras que el de RTM disminuyó, no se encontraron diferencias significativas en el consumo de MS entre los tratamientos RTM0 y RTM4, pero sí las hubo entre RTM4 y RTM8, siendo mayor en el primero. El consumo de N para los distintos tratamientos fue de 658,5 g/d en RTM0, 711,8 g/d en RTM4 y 638 g/d en RTM8. Con respecto a la concentración de urea en plasma, esta no fue afectada por los tratamientos ni la hora, pero sí se detectó un efecto de la interacción tratamiento por hora. En cuanto a la producción y composición de leche, se constató que no hubieron diferencias significativas entre los tratamientos RTM0 y RTM4, pero sí la hubo entre estos y el RTM8, en donde se produjo la menor producción de leche y una menor producción de proteína, 1,06 kg/d, mientras que en los tratamientos restantes la producción de proteína fue de 1,13 kg/d. El MUN fue de 20 mg/dl, y no se vio afectado por los tratamientos.

En función a los antecedentes anteriormente citados, este trabajo buscará contribuir en identificar cual es la combinación de FF y RTM que logre optimizar la utilización de ambos alimentos de manera tal que permita mejorar el aprovechamiento metabólico de N en vacas lecheras.

## **5- Hipótesis:**

El aumento de la proporción de forraje fresco de alta calidad en la dieta de vacas Holando de alta producción alimentadas con una dieta a base de ración totalmente mezclada provocará aumentos en el consumo de nitrógeno disminuyendo la eficiencia de utilización del mismo y aumentando su concentración en el medio interno y excreción al medio ambiente.

## **6- Objetivos:**

### **6.1- Objetivo General:**

Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada sobre el metabolismo de nitrógeno en vacas Holando de alta producción.

### **6.2- Objetivos Específicos:**

- 1) Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada sobre consumo total de nitrógeno.
- 2) Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada sobre la concentración de nitrógeno en leche.
- 3) Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada sobre la concentración de nitrógeno en heces y orina.
- 4) Evaluar el efecto de suministrar distintas combinaciones de un forraje fresco de alta calidad y una ración totalmente mezclada sobre la concentración de nitrógeno en sangre.

## **7- Materiales y Métodos:**

El experimento se realizó en el Campo Experimental N° 2 – Libertad de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, ubicado en la zona de Libertad en el Departamento de San José, Uruguay (34° S y 55° O), en las instalaciones de la Unidad de Metabolismo y Digestión Ruminal de los Departamentos de Nutrición Animal y Producción de Bovinos entre los meses de Junio y Agosto de 2012. El trabajo con animales fue realizado de acuerdo con los reglamentos sobre el uso de animales en experimentación, enseñanza e investigación (Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A), UdelaR, Uruguay), y en el marco del protocolo de investigación aprobado por la Comisión de Experimentación en el Uso de Animales (CEUA) PI 12/13 Exp. 111130-000818-13.

### 7.1- Diseño experimental:

Se seleccionaron 12 vacas Holando, multíparas, de  $523 \pm 88$  kg de PV, ((media  $\pm$  desvío estándar (DE)), de  $90 \pm 22$  días de lactancia, y una producción en la lactancia previa de  $7908 \pm 719$  kg de leche del rodeo de la Unidad de Producción de Leche de dicho Campo Experimental.

Se utilizó un diseño experimental de cuadrado latino 3x3 por cuadruplicado, en los cuales los animales se bloquearon por peso vivo, días en lactación, producción al inicio del experimento y producción de leche en lactancia previa y fueron asignadas al azar a cada cuadrado y dentro de cada cuadrado también por azar se asignó la secuencia de tratamientos.

Los tres tratamientos consistieron en tres tipos de dietas basadas en combinaciones de RTM y FF, y fueron:

- 1) RTM100: oferta *ad libitum* de una RTM;
- 2) RTM75: dieta compuesta por una oferta equivalente al 75% de RTM (de la misma RTM utilizada en RTM100) + una oferta equivalente al 25% de FF; y
- 3) RTM50: dieta compuesta por una oferta equivalente al 50% RTM (de la misma RTM utilizada en RTM100) + una oferta equivalente al 50% FF.

El experimento consistió en tres períodos de 22 días cada uno, donde los primeros 11 días de cada período fueron de adaptación al tratamiento y los 11 días restantes fueron de muestreo y determinaciones.

### 7.2- Manejo de los animales y alimentación:

Los animales fueron alojados en bretes individuales, tuvieron libre acceso a agua fresca y fueron ordeñados dos veces al día (0700 y 1800 h). La pastura que se utilizó para obtener el forraje fresco consistió en un cultivo de raigrás anual (*Lolium multiflorum*), cultivar LE 284, con una disponibilidad inicial de 2500 kg de MS/há. La pastura se cortó diariamente a las 11:00 h, con segadora de discos a una altura aproximada de 10 cm y se almacenó a la sombra con una temperatura ambiente promedio  $9^{\circ}$  C, INIA Las Brujas, entre Junio y Agosto de 2012. El forraje fresco se ofreció individualmente a cada animal según tratamiento. La RTM fue formulada para cubrir los requerimientos de vacas lecheras de 600 kg de PV y con una producción de 35 kg/d según las recomendaciones del NRC (2001). La composición química de la pastura, la RTM y los ingredientes con que fue formulada la RTM, se presenta en el cuadro I, la participación porcentual en MS de los ingredientes de la RTM se presentan en el cuadro II.

**Cuadro I. Composición química<sup>1</sup> del forraje fresco (*Lolium multiflorum*), la ración totalmente mezclada (RTM) y de los alimentos utilizados para formular la RTM (media  $\pm$  DE).**

	Forraje fresco <sup>2</sup>	RTM <sup>3</sup>	SMPE <sup>4</sup>	GHM <sup>5</sup>	HS <sup>6</sup>
MS <sup>7</sup> (%)	17,5 $\pm$ 5,2	38,1 $\pm$ 1,8	23,2 $\pm$ 1,5	78,4 $\pm$ 0,9	90,0 $\pm$ 0,1
<i>Composición (%MS)</i>					
MO <sup>8</sup>	84,9 $\pm$ 1,2	92,7 $\pm$ 0,4	91,63 $\pm$ 0,8	98,3 $\pm$ 0,7	91,6 $\pm$ 0,2
PB <sup>9</sup>	15,1 $\pm$ 2,7	18,0 $\pm$ 0,8	8,10 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,2	50,3 $\pm$ 1,1
FND <sup>10</sup>	40,8 $\pm$ 4,8	41,1 $\pm$ 2,8	52,0 $\pm$ 2,1	8,5 $\pm$ 0,1	18,0 $\pm$ 0,4
FAD <sup>11</sup>	24,1 $\pm$ 2,4	24,6 $\pm$ 0,3	31,0 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,1
CNF <sup>12</sup>	26,3	31,7	29,3	79,3	21,3
EE <sup>13</sup>	2,7 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1
AS <sup>14</sup>	20,0 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,3			
NDIN <sup>15</sup>	0,7 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,1
NIDA <sup>16</sup>	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,1
<i>Composición (Mcal/kg)</i>					
ENL <sup>17</sup>	1,48	1,70			

<sup>1</sup>Promedio de los tres periodos, <sup>2</sup>Forraje fresco, *Lolium multiflorum* Disponibilidad 2500 kg/MS/há; <sup>3</sup>Ración totalmente mezclada; <sup>4</sup>Silo de maíz planta entera; <sup>5</sup>Grano húmedo de maíz; <sup>6</sup>Harina de soja; <sup>7</sup>Materia seca; <sup>8</sup>Materia orgánica; <sup>9</sup>Proteína bruta; <sup>10</sup>Fibra neutro detergente; <sup>11</sup>Fibra ácido detergente; <sup>12</sup>Carbohidratos no fibrosos, calculado como: %CNF = %MO – (%PB + %FND + %EE); <sup>13</sup>Extracto al éter; <sup>14</sup>Azúcares solubles; <sup>15</sup>Nitrógeno insoluble en detergente neutro; <sup>16</sup>Nitrógeno insoluble en detergente ácido; <sup>17</sup>Energía neta de lactación (Mcal/kg), según NRC (2001).

Se determinó la cantidad de MS total ofrecida a cada animal en función al consumo potencial individual medido en los 10 días previos al comienzo del ensayo. El promedio de oferta fue de 30 kg de MS por animal de los cuales el 75% era RTM y el 25% de FF para RTM75 y 50% RTM y 50% de FF para RTM50.

La rutina de asignación diaria de los alimentos comenzó a las 08:00 h (hora 0 del experimento), recibiendo todos los tratamientos una primera sesión de RTM. El tratamiento RTM100 continuó todo el día con RTM a disposición. Los dos tratamientos que incluyen pastura fresca (RTM75 y RTM50), una vez que consumieron la RTM ofrecida pasaron a consumir FF hasta que completaron la cantidad correspondiente según el tratamiento. Luego de completada la sesión de forraje volvieron a consumir RTM hasta completar la cantidad correspondiente.

Durante el ordeño no se les administró ningún tipo de alimento. Se ordeñaban dos veces por día (0700 y 1800 h) en el tambo y luego volvían a sus respectivos bretes donde seguían con los tratamientos asignados. La RTM se mezclaba diariamente y se ofrecían según el tratamiento, reponiendo a medida que los animales la consumían. Los cambios en las dietas durante cada

período de adaptación fueron realizados de forma progresiva, de manera que al tercer día ya estuvieran consumiendo la cantidad de alimento indicado.



## Cuadro II. Ingredientes de la ración totalmente mezclada (RTM).

Ingredientes	% de la MS
Silo de Maíz planta entera	53
Grano húmedo de Maíz	23
Harina de Soja	22
Vitaminas <sup>1</sup>	0,01
Bicarbonato de sodio	0,60
Oxido de Magnesio	0,20
Fosfato di-cálcico	0,40
Cloruro de sodio	0,20
Carbonato de Calcio	0,20
Monensina <sup>2</sup>	0,01
Secuestrante	0,04
Levaduras <sup>3</sup>	0,01

<sup>1</sup>Rovimix® Lecheras, DSM Nutritional Products Ltd. Basilea, Suiza

<sup>2</sup>Rumensin® 100 Premix, Elanco Animal Health, Greenfield, EEUU

<sup>3</sup>Procreatin 7 ®, Elanco Animal Health, Greenfield, EEUU

### 8- Determinaciones y técnicas:

#### 8.1- Consumo de materia seca y Nitrógeno

A partir del día 2 hasta el día 8 inclusive de cada período de mediciones se determinó el consumo individual diario de alimentos tanto de la RTM como del FF, por diferencia de peso entre la cantidad total de alimento ofrecido y rechazado por animal. Se tomaron muestras diarias de los alimentos ofrecidos y rechazados (cuando superó el 20 % de lo ofrecido), y se congelaron a -18°C para su posterior análisis de composición química. A partir del análisis de composición del alimento, se determinó el consumo de N. El consumo de N se estimó a partir de la concentración de N en el alimento y la cantidad de alimento consumida.

#### 8.2- Urea en sangre y leche y Nitrógeno en leche:

Durante el día 11 de cada período de mediciones se tomaron muestras de sangre a cada vaca por veno-punción de la vena coccígea a las 0, 3, 6, 9, 12 y 15 horas (hora 0 = 0800 h). La sangre fue centrifugada y se colectó una muestra del plasma, que fue congelado hasta que se realizó el análisis de urea (método ureasa UV) con kits comerciales (Urea/BUN – Color (BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona – España), la concentración mínima detectable 1,3 mg/dL. Las muestras se analizaron por duplicado usando un espectrofotómetro Unico 1200 series (United Products & Instruments, Inc, NJ, EEUU).

La producción de leche se determinó durante 6 días consecutivos (del día 2 al 7) en cada período de mediciones. Las muestras de leche para el análisis de urea y nitrógeno se tomaron en los 4 ordeños consecutivos durante los días 4 y 5 de cada período de mediciones, donde posteriormente se determinó el contenido de urea en leche por análisis enzimático automatizado (Lefier, 1996) y se determinó contenido de N por el método de análisis de infra-rojo medio (IDF, 2000).

#### 8.4- Nitrógeno en heces, orina y eficiencia de utilización del nitrógeno digestible.

Durante los días 2 y 3 de cada período se colectaron 2 muestras puntuales de orina (15ml) y heces (1400 y 0200h). Las muestras de orina se diluyeron en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,072 N y se congelaron hasta su análisis. Se estimó el volumen total de orina producido diariamente mediante la determinación de creatinina en orina (Valadares y col., 1999). La concentración de creatinina se determinó de la forma descrita por Chizzotti y col. (2008).

Las muestras de heces, se tomaron directamente del recto para estimar producción de heces indirectamente usando fibra detergente ácido indigestible (FDAi) como marcador interno (Huhtanen y col., 1994). Estas muestras, se congelaron a -18°C. Luego de finalizado el periodo experimental estas muestras fueron secadas, molidas y se incubaron en bolsas de Dacron (5 x 10 cm, poros de 50 micrones) en el rumen de 2 vacas secas con fístula en rumen, que fueron alimentadas con una dieta compuesta por 70% de heno de alfalfa y 30% de concentrado comercial. Se consideró FDAi al contenido de FDA en el residuo no digerido tras incubación *in situ* de las bolsas por 12 días consecutivos. La producción de heces se calculó de la forma descrita por Merchen (1993) como:

$$\text{kg MS de Heces/día} = \frac{\text{CFDAi (gr/día)}}{\left[ \text{FDAi heces} \right] \text{ (gr/kg MS)}}$$

Tanto la concentración de N en orina, como en las heces se determinó por método de Kjeldhal.

La eficiencia de utilización de N digestible, se calculó según la fórmula EUND = (g de N secretados en leche)/(g de N digestible ingeridos)x100 (Phuong y col., 2013).

#### 8.5- Balance de N

El balance de N se calculó como la diferencia entre la cantidad (g/d) total de N consumido, y la excreción de N en heces, orina y leche.

#### 8.6- Composición química de los alimentos:

Los análisis de composición química de los alimentos utilizados para las dietas se realizaron en el laboratorio del Departamento de Nutrición de la Facultad de Veterinaria. Las muestras fueron secadas en estufa (60°C, 48 h) y molidas con zaranda de 1 mm. Se le determinó el contenido de MS, cenizas, MO (100-% cenizas), PB (N x 6.25) según A.O.A.C. (1990), nitrógeno insoluble en detergente neutro (Licitra y col., 1996), FDN, FDA y lignina ácido detergente de acuerdo con la técnica descrita por Robertson y Van Soest (1981), usando un analizador de fibra Ankom220 (Ankom Technology Corp. Fairport, NY, USA) y el contenido de AS siguiendo la técnica descrita por Yemm y Willis (1954). El contenido de carbohidratos no fibrosos y de ENL de los alimentos fue calculado a partir de las ecuaciones sugeridas por el NRC (2001). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, aceptando coeficientes de variación máximos entre análisis de 3 o 5 % según el parámetro analizado.

### 8.7- Análisis estadístico:

Los datos se analizarán con la versión 9.0 del software de SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, EE.UU.). Los datos se someterán inicialmente a un análisis para detectar valores atípicos y para comprobar la normalidad de los residuales mediante procedimientos univariantes (PROC UNIVARIATE).

Los datos de las variables con una medición en cada período como consumo, producción y composición de la leche, perfil de AG, balance de nitrógeno, flujo de proteína microbiana, así como las eficiencias de producción de leche se analizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2002) de acuerdo al modelo lineal mixto:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + V_j(C_i) + P_k + T_l + e_{ijkl},$$

donde  $Y_{ijkl}$  es la variable dependiente,  $C_i$  es el efecto aleatorio del cuadrado,  $V_j(C_i)$  efecto variable de vaca dentro del cuadrado,  $P_k$  efecto aleatorio del período,  $T_l$  el efecto fijo del tratamiento y  $e_{ijkl}$  es el error residual.

Los datos de las variables con una medición repetidas en el tiempo en cada período como concentración sanguínea de urea, glucosa e insulina se analizaron utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (2002) de acuerdo al modelo lineal mixto:

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + V_j(S_i) + P_k + T_l + H_m + T_l \times H_m + e_{ijklm},$$

donde  $Y_{ijklm}$  es la variable dependiente,  $C_i$  es el efecto aleatorio del cuadrado,  $V_j(C_i)$  efecto variable de vaca dentro del cuadrado,  $P_k$  efecto aleatorio del período,  $T_l$  el efecto fijo del tratamiento,  $H_m$  efecto fijo de la hora,  $T_l \times H_m$  efecto fijo de la interacción del tratamiento x la hora y  $e_{ijklm}$  es el error residual.

Las medias de todos los parámetros evaluados serán comparadas mediante el test de Tukey. Se aceptarán como diferencias significativas valores de P

inferiores o iguales a 0,05 y como tendencia valores de P mayores a 0,05 y menores a 0,1.

## 9- Resultados:

En el cuadro III se muestra el consumo de MS y el balance de N. El consumo de MS fue menor en el tratamiento RTM50 respecto a los restantes dos tratamientos ( $P=0,018$ ), no se observó diferencias entre RTM100 y RTM75. El consumo de N fue significativamente mayor en RTM100 y RTM75 con respecto a RTM50 ( $P < 0,001$ ), al igual que la excreción de N en leche ( $P=0,004$ ). Para el N en orina se encontraron diferencias entre los tres tratamientos ( $P < 0,001$ ) siendo mayor el RTM100 y menor en RTM50. No se encontraron diferencias para la excreción de N en heces. El nitrógeno en excretas fue mayor para RTM100 y menor para RTM50 ( $P < 0,001$ ).

**Cuadro III. Consumo de MS y N, partición y balance de nitrógeno en vacas holando de alta producción alimentadas con diferentes combinaciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50).**

	Tratamientos <sup>1</sup>			EEM	$P^2$
	RTM100	RTM75	RTM50		T
<b>Consumo de MS, kg/d</b>	24,8 <sup>a</sup>	24,6 <sup>a</sup>	22,8 <sup>b</sup>	0,94	0,018
<b>Consumo de N, g/d</b>	715,3 <sup>ax</sup>	673,1 <sup>ay</sup>	606,5 <sup>b</sup>	26,18	< 0,001
<b>Excreción de N, g/d</b>					
N en Leche	161,6 <sup>a</sup>	159,5 <sup>a</sup>	148,1 <sup>b</sup>	6,10	0,004
N en Orina	335,7 <sup>a</sup>	309,2 <sup>b</sup>	279,7 <sup>c</sup>	13,71	< 0,001
N en Heces	144,5	137,4	134,4	7,16	0,276
N en Excretas	480,0 <sup>a</sup>	446,6 <sup>b</sup>	414,2 <sup>c</sup>	13,23	< 0,001
Balance N	73,6 <sup>a</sup>	66,9 <sup>a</sup>	44,1 <sup>b</sup>	8,26	0,009
valor biológico <sup>3</sup> %	40,7	41,6	40,8	5,03	0,971
<b>N, % del Consumo de N</b>					
N en Leche	22,7 <sup>x</sup>	23,8 <sup>xy</sup>	24,5 <sup>y</sup>	0,72	0,069
N en Orina	47,2	46,4	46,0	1,51	0,771
N en Heces	20,2	20,3	22,2	1,58	0,174
N en Excretas	67,4	66,8	68,2	2,43	0,819
N Retenido	9,8	9,3	7,2	1,91	0,428
<b>EUND<sup>4</sup> %</b>	28,6 <sup>a</sup>	30,0 <sup>ab</sup>	31,6 <sup>b</sup>	0,02	0,009

<sup>a,b</sup>Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ . <sup>xy</sup>Letras diferentes en un mismo renglón indican tendencias,  $0,05 < P > 0,1$ . <sup>1</sup>Tratamientos: RTM100= 100% RTM; RTM75= 75%RTM + 25% FF; RTM50= 50% RTM + 50% FF. <sup>2</sup>P = Efecto de tratamiento. <sup>3</sup>Valor Biológico=[(N consumido - (N heces + N orina)) / (N consumido - N heces)] x 100. CN= Consumo de N. EEM: error estándar de las medias. <sup>4</sup>EUND: Eficiencia de utilización de N digestible. Se calculó según la fórmula  $EUND = (g \text{ de N secretados en leche}) / (g \text{ de N digestible ingeridos}) \times 100$  (Phuong y col., 2013).

El balance de N fue positivos para los tres tratamientos, pero fue menor para RTM50 respecto a RTM100 y RTM75 ( $P=0,009$ ).

Cuando se expresó el N excretado en leche, orina, heces y retenido como porcentaje del N consumido, se observa una tendencia del tratamiento RTM50 a excretar mayor porcentaje de N en leche que RTM100 ( $P=0,069$ ) La eficiencia

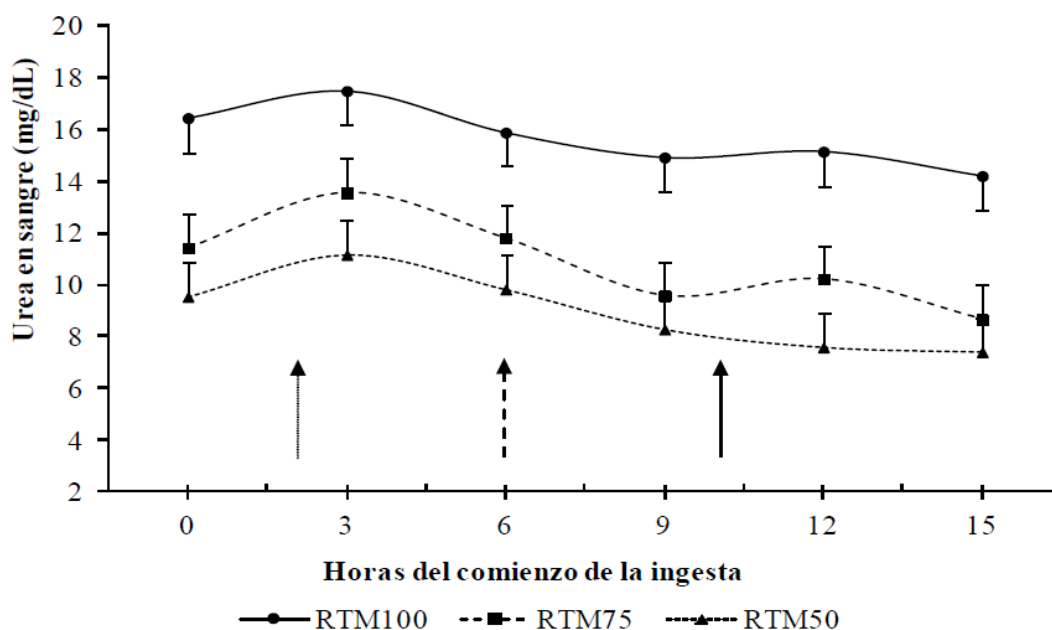
de utilización del N digestible para síntesis de N en leche, fue mayor para RTM50 respecto a RTM100 ( $P < 0,009$ ), mientras que RTM75 no fue diferente de RTM100 ni de RTM50.

En el cuadro IV se presenta las medias de los valores de urea en sangre y leche para los diferentes tratamientos. Con respecto a BUN se observó diferencias entre los tres tratamientos, siendo RTM100 quien presentó el mayor valor, seguido de RTM75, presentando el menor valor RTM50 ( $P < 0,001$ ). No se detectó efecto de la interacción tratamiento x hora pero sí un efecto hora (Gráfico I). El MUN fue menor en RTM50 respecto a RTM100 y RTM75 ( $P = 0,001$ ), no observándose diferencias entre RTM100 y RTM75.

**Cuadro IV. Concentración de urea en sangre y leche en vacas holando de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de ración totalmente mezclada y forraje fresco.**

	Tratamientos <sup>1</sup>				P <sup>2</sup>		
	RTM100	RTM75	RTM50	EEM	T	H	TxH
mg/dL							
Urea en sangre	15,68 <sup>a</sup>	10,87 <sup>b</sup>	8,96 <sup>c</sup>	1,32	<0,001	<0,001	0,857
Urea en leche	24,7 <sup>a</sup>	22,8 <sup>a</sup>	20,5 <sup>b</sup>	1,83	0,001	—	—

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ . <sup>1</sup> Tratamientos: RTM100= 100% RTM; RTM75= 75%RTM + 25% FF; RTM50= 50% RTM + 50% FF. <sup>2</sup> P: T= Efecto de tratamiento; H= Efecto de la hora; TxH= efecto de la interacción del tratamiento y la hora. EEM= Error estándar de las medias.



**Gráfico I. Nivel de urea en sangre de vacas lecheras de alta producción alimentadas con diferentes proporciones de RTM y FF (RTM100, RTM75, RTM50)** (media  $\pm$  error estándar de la media). RTM100 = 100% RTM, RTM75 = 75% RTM + 25% forraje fresco, RTM 50 = 50% RTM + 50% forraje fresco.

.....→ = RTM75 y RTM50 comienzan con ingesta de forraje fresco.

- - - → = RTM75 retoman la ingesta de RTM. — → = RTM50 retoman la ingesta de RTM.

Los valores promedios de uremia presentaron el valor máximo a la hora 3 después del inicio de la ingesta en los tres tratamientos. Para el tratamiento RTM50 la uremia desciende gradualmente hasta la hora 15 del inicio de la ingesta donde se observa el menor valor. Sin embargo para ambos tratamientos con mayor porcentaje de RTM, se observa un leve ascenso de los valores sobre la hora 9 del inicio de la ingesta para luego presentar el menor valor sobre la hora 15.

## 10- Discusión:

En nuestro trabajo se observó un mayor consumo de MS en las dietas RTM100 y RTM 75 (24,8 kg/d y 24,6 kg/d) y menor en RTM50 (22,8 kg/d). Esto se explica por el porcentaje de MS que posee el RTM,  $38,1 \pm 1,8\%$  a diferencia del FF,  $17,5 \pm 5,2\%$  de MS ya que el consumo está regulado por varios factores, entre ellos, factores propios del alimento como la composición, digestibilidad, palatabilidad, y contenido en MS (Forbes, 1996). Este mismo comportamiento se observa en los siguientes trabajos. En el experimento realizado por Soriano y *col.*, (2001), el consumo de MS fue similar para los tres tratamientos, alcanzando un consumo de 26,6 kg/d MS. Este resultado es similar al presente trabajo, para el caso de la dieta RTM75 que se obtuvo similar consumo que la dieta RTM100. En cuanto al experimento de Soriano y *col.*, (2001) las dietas eran 100% RTM, 76,3% RTM 23,7% pastura y 65,8% RTM 34,2% pastura. El porcentaje de MS de la RTM, en éste experimento, era de 61,7%, y el de la pastura de 18,0%.

Lo más interesante es la ausencia de diferencia en el consumo de TMR100 VS RTM75 y por qué se cae en RTM50.

Kolver y Muller (1998) compararon el consumo de nutrientes en vacas lecheras de alta producción alimentadas en base a pastura o RTM, y observaron mayor consumo de MS en el tratamiento con RTM; 23,4 kg/d vs 19,0 kg/d. Siendo el porcentaje de MS del RTM de 58,2% y el del FF de 17,0%. Resultados similares obtuvieron Bargo y *col.*, (2002), en este caso el porcentaje de MS de la RTM era de  $54,5 \pm 1,9\%$  y el de la pastura, un promedio de 17,4%. Sprunk, y *col.*, (2012b) observaron que el consumo de MS de la RTM ( $29,69 \pm 1,76$  kg/d) fue mayor que en el de pastura más suplementación ( $23,93 \pm 0,9$  kg/d).

Vibart y *col.*, (2008) utilizaron dietas combinando diferentes proporciones de RTM y pasturas, el consumo de MS para 100% RTM fue de mayor que las distintas combinaciones de RTM y pasturas. En cuanto al porcentaje de MS de los alimentos, la RTM tuvo un % mayor de MS que la pastura. En el experimento de Mendoza y *col.*, (2012b) el consumo de MS fue mayor en TMR4 que TMR8 (25,6 vs 22,6 kg), pero no se detectaron diferencias con TMR0 (24,5 kg).

En el presente trabajo, el mayor consumo de N se observó en las dietas con mayor porcentaje de RTM (RTM100 con 715,36 g/d, RTM75 673,16 g/d, RTM50 606,55 g/d). Este resultado se debe a que el porcentaje de PC del RTM (18%) siempre estuvo por encima al del FF (15-17%). El porcentaje de PC de la pastura utilizada en el presente trabajo puede ser debido al bajo nivel de fertilización de la pastura desde su implantación (Pomiés, 2014).

En cuanto a Kolver y Muller (1998), Bargo y *col.* (2002) y el experimento en otoño de Vibart y *col.* (2008), no encontraron diferencias en el consumo de N entre FF y RTM, pero a diferencia del presente trabajo, el porcentaje de PC de las pasturas utilizadas fue mayor. Por ejemplo Kolver y Muller (1998) utilizaron una mezcla de 53% de raigrás, 19% de trébol blanco y otros como festuca y

dactilis con un porcentaje de PC de 25,1%, además se fertilizó una vez con 110 kg N/ha. Bargo y col. (2002) si bien no utilizó raigrás, el porcentaje de PC de la mezcla fue de 26,3%, y fertilizó 5 veces con 50 kg N/ha. En cuanto a Vibart y col. (2008) en su experimento en otoño utilizaron raigrás con 24% de PC y una fertilización de 40 kg N/há. Estos datos explicarían la diferencia en cuanto a consumo de N del presente trabajo con respecto a los mencionados.

Por otro lado, Sprunk y col. (2002b), Soriano y col. (2001), Mendoza y col. (2012b) y Vibart y col. (2008) en su trabajo en primavera, al igual que el presente trabajo encontraron diferencias en el consumo de N. Sin embargo Sprunk y col. (2002b) observaron mayor consumo de N en la dieta con FF más concentrado, utilizando una mezcla de 30% trébol blanco y 70% festuca con 24-26% de PC y el RTM con 17% de PC al igual que Soriano y col. (2001) que obtuvieron mayor consumo de N en las dietas con FF (dactilis y trébol blanco) con un porcentaje de PC de 27% y el RTM 18%. Mendoza y col. (2012b) observaron que el consumo de N fue mayor en el RTM4 (4 hs. de acceso a la pastura); utilizó raigrás con 22,1% de PC y una RTM con 16,8%. En el caso de Vibart y col. (2008) se observó mayor consumo de N en la dieta 100% RTM ya que el forraje utilizado poseía 14% de PC debido a que no recibió fertilización nitrogenada y el RTM 16% de PC.

El N excretado en leche fue menor en el tratamiento con mayor porcentaje de FF en la dieta respecto a los 2 con menor nivel de inclusión de FF (RTM100 y RTM75). Esto podría estar relacionado con el consumo de N, ya que coincidentemente, RTM50 fue el que presentó el menor consumo de N. Estos resultados coinciden con los reportados por Kolver y Muller (1998), Bargo y col. (2002) y Vibart y col. (2008) (experimento en primavera), quienes obtuvieron un mayor contenido de N en leche en los tratamientos con RTM, aún cuando los consumos de N fueron similares.

Sprunk y col. (2012b) observaron que a pesar de que el mayor contenido de N en leche se presentó en la dieta con RTM, el mayor consumo de N fue en la dieta con FF (914 g/d vs. 812 g/d). Algo similar observaron Mendoza y col. (2012a), donde los animales consumiendo la dieta sin acceso FF (RTM0) y con 4 hs de acceso a FF (RTM4) presentaron la mayor cantidad de N en leche, sin embargo el consumo de N fue mayor en RTM4. Soriano y col. (2001), no observaron diferencias en N en leche, a pesar de que las dietas con FF presentaron mayores consumos de N.

Con respecto al BUN en el presente trabajo, se encontraron diferencias significativas al comparar los tres tratamientos (RTM100 15,68 mg/dL; RTM75 10,87 mg/dL; RTM50 8,96 mg/dL). Debido a que el BUN está influenciado positivamente por la ingesta de proteína degradable e indigestible (DePeters y Ferguson, 1992), la ingestión de ambas fracciones de la proteína podría ser la explicación de los valores de BUN observados en este trabajo.

En el presente trabajo los animales con mayores valores de BUN fueron los que consumieron mayor porcentaje de RTM, y como consecuencia, los que consumieron mayores niveles de proteína ( $18,0 \pm 0,8\%$ ). Resultados similares fueron observados por Vibart y col. (2008), donde el mayor valor de BUN fue



observado en el tratamiento con mayor porcentaje de RTM en la dieta de los animales (13,9 mg/dl). Los autores lo atribuyen al menor contenido de PC de la pastura comparado con la RTM.

De manera contraria a nuestros resultados, Bargo y *col.* (2002) observó que los niveles de BUN fueron mayores para el tratamiento con mayor cantidad de pastura en la dieta (P+C). Los autores también atribuyen estos resultados al contenido de PC en la dieta, ya que las concentraciones de PC en la pastura fueron superiores a los de la RTM.

Por otro lado, en el trabajo realizado por Mendoza, y *col.* (2012d), observaron que la concentración de PUN no fue afectada por los tratamientos (RTM0, RTM4, RTM8).

El MUN, fue significativamente menor para RTM50 (20,5 mg/dL) en comparación con RTM100 (24,7 mg/dL) y RTM75 (22,8 mg/dL). Al igual que en el experimento de primavera de Vibart y *col.* (2008), el MUN disminuyó con el aumento de la ingesta de pastura (en estado de madurez avanzado). Dicho autor adjudicó este resultado a un menor consumo de proteína en la dieta (el porcentaje de PC de la pastura fue de 13,9%). Si tenemos en cuenta las concentraciones de PC del FF y de la RTM en nuestro trabajo, es posible que la explicación del resultado coincida con la de estos autores.

Coincidentemente, en nuestro trabajo observamos que el tratamiento RTM50 presentó una mayor eficiencia de utilización del N con respecto a RTM100 y esto también podría estar explicando los menores valores de MUN, ya que que el exceso de MUN representa la PC en la dieta que no está siendo utilizada para producción y por lo tanto, cuanto menor sea el MUN mayor es la eficiencia de utilización del N (DePeters y Ferguson, 1992).

Contrariamente, Bargo, y *col.*, (2002), observaron que el MUN fue más bajo en las dietas de 100% RTM y RPM que en pastura más concentrado. Este resultado podría explicarse por la mayor cantidad de energía que tienen las dietas RTM, ya que según DePeters y Ferguson, (1992) el MUN está influenciado negativamente por la ingesta de energía, donde un aumento del consumo de energía, reduce tanto el N-NH<sub>3</sub> en rumen como el MUN. En dicho trabajo la energía neta de lactación (ENL) para la dieta 100% RTM fue de 43,7 Mcal/d, para la dieta RPM fue de 40,2 Mcal/d y por último la dieta de pastura más concentrado fue de 35,3 Mcal/d.

De igual manera que para PUN, Mendoza y *col.* (2012a), no observaron diferencias entre tratamientos para los valores de MUN.

Con respecto al N en orina y heces no se encontraron trabajos donde se comparen esta combinación de sistemas de alimentación y que reporten resultados al respecto.

En el presente trabajo, el N en orina, se observa que existen diferencias significativas entre los tres tratamientos, siendo mayor en el tratamiento RTM100 (335,7 g/d), siguiendo con el tratamiento RTM75 (309,26 g/d) y menor en RTM50 (279,76 g/d). Este comportamiento está dentro de lo esperado ya

que a mayor cantidad de proteína degradable en rumen, más N se absorbe como  $\text{NH}_3$ , lo que podría aumentar la excreción de N en orina (Castillo y col., 2001; Kebreab y col., 2002). Del mismo modo Church, (1993) explica que la cantidad de urea excretada por los rumiantes, así como también la proporción de N urinario total, han demostrado estar correlacionados positivamente con la ingestión de N digestible.

Con respecto al N en heces no se observó diferencias significativas entre tratamientos, tanto expresado en g/d como expresado como porcentaje del consumo de N. Si bien el N excretado en heces en vacas lecheras parece ser constante en proporción al consumo de MS (Castillo y col., 2000), la ausencia de diferencias, en cuanto a la excreción de N en heces entre tratamientos, podría estar explicado por el estrecho margen de consumo de MS observado en los animales en este trabajo. También se explica por la similar digestibilidad de la MS de los tres tratamientos.

La eficiencia de utilización del N, presentó diferencias entre los tratamientos siendo el tratamiento RTM50 (31,6%) el que presentó mayor eficiencia en utilización y un mayor contenido de N en leche (24,5%).

Estos resultados no fueron los esperados ya que se esperaba obtener mayor eficiencia de utilización del N en los tratamientos con mayor porcentaje de RTM en la dieta debido a que la harina de soja, que es uno de los componentes de la RTM, teóricamente presenta buenos niveles de proteína indegradable en rumen, que la pastura no posee, lo que genera mayor utilización del N.

En este sentido, Kolver y Muller (1998) observaron una menor eficiencia de utilización del N con la dieta con pasturas. Si bien las dietas presentaron el mismo consumo de N, tuvo una extensa digestión a nivel ruminal, una menor captura de N en leche y mayor excreción del mismo, además el costo metabólico de síntesis y excreción de urea adicional disminuyó la eficiencia.

Como ya mencionamos el consumo de N en nuestro trabajo fue menor en el tratamiento con mayor proporción de pasturas (RTM50), lo que podría explicar las diferencias en los resultados obtenidos de eficiencia de utilización.

El MUN puede ser una herramienta útil que predice la eficiencia de utilización del N de la dieta (Broderick and Clayton, 1997). Altos valores del mismo indican su ineficiencia que pueden resultar de varios factores nutricionales, incluyendo exceso de proteína, energía inadecuada, o el exceso de proteína degradable en rumen (Jonker y col., 1998).

En el presente trabajo el balance de N en los tres tratamientos fue positivo, es decir que se consumió más de lo que se excretó, sin embargo hubieron diferencias significativas entre dichos tratamientos, RTM50 fue menor con respecto a los dos restantes, pero cuando se calculó el porcentaje de N retenido en base al consumo de N, no presentó diferencias, es decir que dicho N retenido es metabolizado para utilizarlo por el propio organismo. Así mismo es posible que al encontrarse las vacas en lactancia media, donde el período

de mayor movilización ya ha transcurrido, podían haber metabolizado mayor cantidad de N para tejidos.

Asimismo se observó que el tratamiento RTM100 tuvo el mayor consumo de N y la menor eficiencia de utilización del mismo, este hecho se podría explicar por el consumo excesivo de proteína, ya que la energía consumida por dicho tratamiento fue la máxima siendo de 42,16 Mcal/d. Este mayor consumo de energía pudo haber sido utilizada para la detoxificación de  $\text{NH}_3$  a urea en el hígado, reafirmando la idea de que superar los requerimientos de proteína necesarios por el animal, produce mayores gastos energéticos por parte del animal como también costos económicos por parte del productor.

## **11- Conclusión:**

La inclusión de forraje fresco, en dietas a base de ración totalmente mezclada, influyó en el metabolismo del N, ya que la urea en sangre, urea en leche y N en orina, fueron menores cuanto mayor proporción de forraje fresco era incluido en la dieta. Estos resultados son consecuencia del menor consumo total de materia seca y al bajo porcentaje de proteína en el forraje fresco lo que se traduce en un menor consumo de N, disminuyendo su excreción y aumentando la eficiencia de utilización del mismo.

## 12- Bibliografía:

1. Association of Official Agricultural Chemists (1990). Official methods of analysis. 15ª Ed. Arlington VA, A.O.A.C. p. 685-1213.
2. Bach, A., Calsamiglia, S., y Stern, M. D. (2005). *Nitrogen metabolism in the rumen*. *Journal of dairy science*, 88(1), E9-E21.
3. Bargo, F., Muller, L. D., Delahoy, J. E., Cassidy, T. W. (2002). *Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations*. *Journal of Dairy Science*, 85(11): 2948-2963.
4. Beever, D.E., Siddons, R.C. (1986). *Digestion and metabolism in the grazing ruminant*. En Milligan L.P., W.L. Grovum, A. Dobson (Eds.), *Control of Digestion and metabolism in Ruminants*. Englewood Clifs, NJ: Prentice-Hall p. 479-497.
5. Broderick, G. A. (2003). *Effect of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows*. *J. Dairy Sci.* 86:1370-1381.
6. Broderick, G. A. y Clayton, M. K. (1997). *A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen*. *Journal of Dairy Science*, 80(11): 2964-2971.
7. Burgos, S. A., Fadel, J. G. y DePeters, E. J. (2007). *Prediction of ammonia emission from dairy cattle manure based on milk urea nitrogen: relation of milk urea nitrogen to urine urea nitrogen excretion*. *Journal of Dairy Science*, 90(12): 5499-5508.
8. Cajarville, C., Mendoza, A., Santana, A. y Repetto, J. L. (2012). *En tiempos de intensificación productiva... ¿cuánto avanzamos en el conocimiento de los nuevos sistemas de alimentación de la vaca lechera?* *Veterinaria*, 48(Suppl. 1): 35-39.
9. Cajarville, C., Britos, A., Caramelli, A., Antunez, M., Zanoniani, R., Boggiano, P., Repetto, J. L. (2007). *El horario de corte y el tipo de metabolismo fotosintético afecta la relación azúcares/nitrógeno de las pasturas*. XX Reunión Latinoamericana de Producción Animal, Cusco, Perú. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 15 (Supl. 1): 408-409.
10. Calsamiglia, S., Bach, A., De Blas, C., Fernandez, C., Garcia-Rebollar, P. (2009). *Necesidades nutricionales para rumiantes de leche*, Normas FEDNA. Madrid, Peninsular p. 15-30.
11. Castillo, A. R., Kebreab, E., Beever, D. E., Barbi, J. H., Sutton, J. D., Kirby, H. C., France, J. (2001). *The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets*. *Journal of Animal Science*, 79(1): 247-253.
12. Castillo, A. R., Kebreab, E., Beever, D. E. y France, J. (2000). *A review of efficiency of nitrogen utilization in lactating dairy cows and its relationship with*. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 9(1): 1-32.
13. Chaudry, A. S. (2008). *Forage based animal production systems and sustainability, an invited keynote*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(1): 78-84
14. Chilbroste, P. (2002). *Integración de patrones de consumo y oferta de nutrientes para vacas lecheras en pastoreo durante el período otoño-*

- invernal. Jornadas Uruguayas de Buiatría, XXX, 90-96. Paysandú, Uruguay.*
15. Chilbroste, P. (1998). *Fuentes comunes de error de alimentación del ganado lechero en pastoreo: II. Balance de nutrientes. Jornadas Uruguayas de Buiatría, XXVI, Paysandú, Uruguay, 8-12.*
  16. Chizzotti, M. L., Valadares Filho, S. C., Valadares, R. F. D., Chizzotti, F. H. M., Tedeschi, L. O. (2008). *Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. Livest Sci 113:218-225.*
  17. Church, C. D. (1993). *El Rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, Acribia, p. 255-282.*
  18. Clark, J. H., Klusmeyer, T. H. y Cameron, M. R. (1992). *Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. Journal of dairy science, 75(8): 2304-2323.*
  19. Coppock, C. E., Bath, D. L. y Harris, B. (1981). *From Feeding to Feeding Systems. Journal of dairy science, 64(6): 1230–1249.*
  20. Coppock, C. E. (1977), *Feeding Methods and Grouping Systems. Journal of Dairy Science, 60(8): 1327–1336.*
  21. Cunningham, J. G., Klein, B. G. (2009). *Fisiología veterinaria. Madrid: Elsevier, p. 263-342.*
  22. Curso de nutrición 2013,  
[http://www.fvet.edu.uy/sites/default/files//nutrici%C3%B3n/Carbohidratos%20en%20rumiantes\\_2013.pdf](http://www.fvet.edu.uy/sites/default/files//nutrici%C3%B3n/Carbohidratos%20en%20rumiantes_2013.pdf)
  23. DePeters, E. J. y Ferguson, J. D. (1992). *Non protein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. Journal of Dairy Science, 75(11): 3192-3209.*
  24. DIEA, (2013). Estadísticas del sector lácteo 2012. *Serie de trabajos especiales, N° 313, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.* Recuperado desde:  
<http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,5,104,O,S,0,7428%3BS%3B1%3B106>. Fecha de consulta: 15/12/2014.
  25. Elrod, C. C. y Butler, W. R. (1993). *Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. Journal of Animal Science, 71(1): 694-694.*
  26. Ferguson, J. D., Chalupa, W. (1989). *Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. Journal of Dairy Science, 72(3): 746-766.*
  27. Forbes, J.M. 1996. Integration of regulatory signals controlling forage intake in ruminants. *J. Anim. Sci. 74:3029– 3035.*
  28. Gachuri, C.K. y Wahome, R. G. (2001). *Total Mixed Rations Versus Traditional feeding of Dairy Cows: Which way to go? The Kenya Veterinarian, 21: 12-15.*
  29. Gehman, A. M., Bertrand, J. A., Jenkins, T. C., y Pinkerton, B. W. (2006). *The effect of carbohydrate source on nitrogen capture in dairy cows on pasture. Journal of dairy science, 89(7): 2659-2667.*
  30. Hall, M. B. y Huntington, G. B. (2008). *Nutrient synchrony: sound in theory, elusive in practice. Journal of animal science, 86(14): E287-92.*
  31. Hoekstra, N.J., Schulte, R.P.O., Struik, P.C., Lantinga, E.A. (2007). Pathways to improving the N efficiency of grazing bovines. *Eur. J. Agron. 26: 363–374.*

32. Huhtanen, P., Kaustell, K., y Jaakkola, S. (1994). *The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. Anim Feed Sci Technol* 48:211-227.
33. IDF. International Dairy Federation. (2000). Whole milk - Determination of milkfat, protein and lactose content - Guidance for the operation of mid-infrared instruments. IDF Standard N° 141C. Brussels, Belgium. 12 p.
34. Jonker, J. S., Kohn, R. A. y Erdman, R. A. (1998). *Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science*, 81(10): 2681-2692.
35. Kauffman, A. J. y St-Pierre, N. R. (2001). *The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. Journal of dairy science*, 84(10): 2284-2294.
36. Kebreab, E., France, J., Mills, J. A. N., Allison, R. y Dijkstra, J. (2002). *A dynamic model of N metabolism in the lactating dairy cow and an assessment of impact of N excretion on the environment. Journal of animal science*, 80(1): 248-259.
37. Kolver, E.S. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proc Nut Soc* 62: 291–300.
38. Kolver, E. S. y Muller, L. D. (1998). *Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. Journal of Dairy Science*, 81(5): 1403-1411.
39. Lammers, B.P., Heinrichs, A., Ishler, V.A. (2002). *Uso de ración total mezclada (TMR) para vacas lecheras*. Departamento de Ciencias Animales, Universidad Estatal de Pennsylvania, 324 Henning Building University Park, PA 16802.
40. Lefier, D. (1996). *Analytical methods for the determination of the urea content in milk. Bull. IDF*. 315:35-38.
41. Licitra, G., Hernandez, T. M., y Van Soest, P. J. (1996). *Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. Anim Feed Sci Technol* 57:347-358.
42. Majeesh, S. J., Arieli, A., Bruckental, I., Zamwell, S. y Tagari, H. (1997). *Effect of ruminal degradability of crude protein and nonstructural carbohydrates on the efficiency of bacterial crude protein synthesis and amino acid flow to the abomasum of dairy cows. Journal of Dairy Science*, 80(11): 2939-2949.
43. Mangan, J.L. (1982). *The nitrogenous constituents of fresh forages*. En Thomson D.J., D.E. Beaver, R.G. Gunn (Eds.), *Forage Protein in Ruminant Animal Production*. (pp. 25-40). Haddington: D. y J. Croal.
44. Manual Pasturas, Implantación y manejo de pasturas, Material de apoyo para el curso “Manejo de Pasturas”, Julio de 2010.
45. McDonald P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F. D. (2006), *Nutrición animal*, Zaragoza, Acribia, p. 167-203.
46. McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D. & Morgan, C. A., (1999), *Nutrición Animal*. Zaragoza, Acribia, 163-202.
47. Mendoza, A., La Manna, A., Crespi, D., Crowe, M.A., y Cavestany, D. (2008). *Whole sunflower seeds as a source of polyunsaturated fatty acids for grazing dairy cows: Effects on metabolic profiles and resumption of postpartum ovarian cyclicity. Livest Sci* 119: 183–193.
48. Mendoza, A.; Cajjarville, C.; De la Quintana, E.; Garmendia, M. E.; Mutuberría, E.; De Torres, E., Repetto, J. L (2012a). *Milk yield and*

- composition of dairy cows fed diets combining pasture and total mixed ration, J. Dairy Sci. 95 (Suppl 2): 249.*
49. Mendoza A.; Cajarville C.; Colla R.; Gaudentti G.; Martín M. E.; Repetto J. L. (2012b) *Dry matter intake and behavior patterns of dairy cows fed diets combining pasture and total mixed ration. J. Dairy Sci. 95 (Suppl. 2): 716.*
  50. Mendoza A., Cajarville C., Amaral V., Piroto E., Puig M., Repetto J.L. (2012c) *Concentración de nitrógeno amoniacal y pH ruminal en vacas lecheras alimentadas con forraje fresco y ración totalmente mezclada. Veterinaria (Montevideo) 48 (Suppl. I): 150*
  51. Mendoza A., Cajarville C., Félix, A., Pérez-Ruchel, A., Duvos, M., Iriarte A., Machiavello, N., Repetto J.L (2012d). *Concentración plasmática de insulina, glucosa y urea en vacas lecheras alimentadas con forraje fresco y ración totalmente mezclada. Veterinaria (Montevideo), 48 (Suppl. I) p.150, 2012.*
  52. Merchen, N.R. (1993). *Digestion, absorption and excretion in ruminants. En: Church DC The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition, Illinois, Waveland, p. 172-201.*
  53. National Research Council. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle. 7<sup>a</sup> ed. Washington, National Academy, 381 p.*
  54. Nocek, J. E. y Russell, J. B. (1988). *Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. Journal of Dairy Science, 71(8): 2070-2107.*
  55. Oltner, R., Emanuelson, M. y Wiktorsson, H., 1985. *Urea concentrations in milk in relation to milk yield, live weight, lactation number and amount and composition of feed given to dairy cows. Livest. Prod. Sci., 12: 47-57.*
  56. Pomies, N., 2014. *Combinación de diferentes niveles de forraje fresco y ración totalmente mezclada en dietas de vacas lecheras: efecto sobre el aprovechamiento digestivo. Tesis de maestría en producción animal, Facultad de Veterinaria (UDELAR).*
  57. Phuomg, H.N., Friggens, N.C., de Boer, J.M. y Schmidely, P., 2013. *Factors affecting energy and nitrogen efficiency of dairy cows: A meta-analysis. Journal of Dairy Science, 96: 7245-7259.*
  58. Relling, A., Mattioli, G. (2003). *Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Fac. Ciencias Veterinarias. Argentina: Universidad Nacional de La Plata. 72 p.*
  59. Repetto, J. L., Cajarville, C. (2009). *¿Es posible lograr la sincronización de nutrientes en sistemas pastoriles intensivos? Jornadas Uruguayas de Buiatría, XXXVII, Paysandú, Uruguay, p. 60-67.*
  60. Robertson, J.B., Van Soest, P.J., (1981). *The detergent system of analysis and its application to human foods. En: James WPT, O. Theander, M. Dekker. The analysis of dietary fiber in food. Ed N.Y.*
  61. Ryan, W., Hennessy, D., Murphy, J. J., Boland, T. M. y Shalloo, L. (2011). *A model of nitrogen efficiency in contrasting grass-based dairy systems. Journal of dairy science, 94(2): 1032-1044.*
  62. SAS. 2002. *Statistical Analysis Systems Institute. SAS Version 9. SAS.*
  63. Shimada Miyasaka, A. (2003). *Nutrición animal. México: Trillas, 388 p.*
  64. Soriano, F. D., Polan, C. E. y Miller, C. N. (2001). *Supplementing pasture to lactating Holsteins fed a total mixed ration diet. Journal of dairy science, 84(11): 2460-2468.*



65. Spahr, S. L. y Harshbarger, K. E. (1971). *Effect of production and ration composition on production performance of cows fed mixed rations of corn silage and concentrates. Journal of Dairy Science*, 54(2): 207-216.
66. Spek, J. W., Bannink, A., Gort, G., Hendriks, W. H. y Dijkstra, J. (2013). *Interaction between dietary content of protein and sodium chloride on milk urea concentration, urinary urea excretion, renal recycling of urea, and urea transfer to the gastrointestinal tract in dairy cows. Journal of Dairy Science*, 96(9): 5734-5745.
67. Sprunck, M., Mattiauda, D., Motta, G., Fajardo, M. y Chilibroste, P. (2012a). *Efecto de la asignación de forraje sobre la producción de leche y sólidos de vacas Holando a inicio de la lactancia en otoño: efectos directos y residuales, Veterinaria*, 48 (Suppl 1): 155.
68. Sprunck, M., Mattiauda, D., Motta, G., Fajardo, M. y Chilibroste, P. (2012b). *Respuesta productiva de vacas Holando a estrategias contrastantes de alimentación al inicio de la lactancia en primavera: pastoreo más suplementación vs. dieta totalmente mezclada, Veterinaria*, 48(Suppl 1): 156.
69. Tamminga, S. (1992). *Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. J. of Dairy Sci.*, 75(1): 345-357.
70. Valadares RFD, Broderick GA, Valadares Filho SC, y Clayton MK. (1999) *Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. J. Dairy Sci.* 82: 2686-2696.
71. Van Vuuren, A. M. (1993). *Digestion and nitrogen metabolism of grass fed dairy cows. Wageningen University dissertation N° 1722*, p. 134.
72. Van Vuuren, A. M., Van der Koelen, C. J., Valk, H. y De Visser, H. (1993). *Effects of partial replacement of ryegrass by low protein feeds on rumen fermentation and nitrogen loss by dairy cows. Journal of Dairy Science*, 76(10): 2982-2993.
73. Van Vuuren, A. M., Tamminga, S. y Ketelaar, R. S. (1991). *In sacco degradation of organic matter and crude protein of fresh grass (Lolium perenne) in the rumen of grazing dairy cows. The Journal of Agricultural Science*, 116(03): 429-436.
74. Van Vuuren, A. M., Tamminga, S., y Ketelaar, R. S. (1990). *Ruminal availability of nitrogen and carbohydrates from fresh and preserved herbage in dairy cows. Netherlands Journal of Agricultural Science*, 38(3B): 499-512.
75. Vibart, R. E., Fellner, V., Burns, J. C., Huntington, G. B. y Green, J. T. (2008). *Performance of lactating dairy cows fed varying levels of total mixed ration and pasture. Journal of dairy research*, 75(4): 471-480.
76. Yemm, E.W., y Willis, A.J., (1954). *The estimation of carbohydrates in plant extract by anthrone. Biochem J* 57:508.