

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**SUPLEMENTACIÓN Y FRECUENCIA DIARIA DE SUMINISTRO DEL
CONCENTRADO EN VAQUILLONAS DE CARNE: EVALUACIÓN DE LA
CAPACIDAD FERMENTATIVA DEL INOCULO RUMINAL MEDIANTE LA
TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO***

por

CRUCCI NUÑEZ, Luis Ignacio

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

2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Presidente de mesa:

Segundo miembro (Tutor):

DCV. MSc. Germán Antúnez

Tercer miembro:

Cuarto miembro (Co-tutor):

DMTV. PhD. Cecilia Cajarville

Fecha:

Autores:

Br. Luis Ignacio Crucci

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional y constante.

Al Dr. German Antúnez por su tutoría y dedicación a lo largo del trabajo y a la Dra. Cecilia Cajarville por su cotutoría y respaldo brindado.

A Florencia por estar siempre y por su ayuda, incentivo y apoyo en este último trayecto.

A mis amigos de la vida por acompañarme en todos estos años.

A mis compañeros en el ensayo experimental, funcionarios del Campo Experimental N°2 Libertad y Biblioteca de Facultad de Veterinaria.

A los Departamentos de Bovinos y Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria por la ayuda en el trabajo de campo y laboratorio fundamentales para realizar este ensayo.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
4.1. Ambiente ruminal y actividad fermentativa en bovinos.	4
4.2. Suplementación de rumiantes.....	6
4.3. Producción de gas <i>in vitro</i>	7
5. HIPÓTESIS	9
6. OBJETIVO	9
7. MATERIALES Y MÉTODOS	10
7.1. Animales y tratamientos	10
7.2. Producción de gas <i>in vitro</i>	11
7.3. Análisis estadísticos	13
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
9. CONCLUSIONES.....	16
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros		Página
Cuadro I.	Composición química de los alimentos utilizados	10
Cuadro II.	Composición química de los sustratos utilizados en la técnica de producción de gas <i>in vitro</i>	11
Cuadro III.	Composición de las soluciones utilizadas en el medio de incubación para la producción de gas <i>in vitro</i>	12
Cuadro IV.	Efecto de la suplementación y la frecuencia de suministro del grano de maíz sobre los parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> de distintos sustratos incubados.	14

LISTA DE ABREVIATURAS

a: producción potencial de gas

AA: aminoácidos

AGV: ácidos grasos volátiles

CO₂: dióxido de carbono

EE: extracto etéreo

FAD: fibra ácido detergente

FDN: fibra detergente neutro

K_d: tasa fraccional de producción de gas

lag: tiempo de retraso en la producción de gas

L: tiempo de retraso en la producción de gas

MO: materia orgánica

m.o.: microorganismos

MS: materia seca

N: nitrógeno

NH₃: amoníaco

N-NH₃: nitrógeno amoniacal

P: presión en psi

P: probabilidad

PB: proteína bruta

PV: peso vivo

R²: coeficiente de determinación

t: tiempo de incubación

T: tratamiento

S: sustrato

V: volumen total de gas producido

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad fermentativa del inóculo ruminal de vaquillonas alimentadas con raigrás (MO 91%; PB 9,0%; FDN 53%) como único alimento o suplementadas con grano de maíz seco molido (MO 99%; PB 7%; FDN 10%) ofrecido en diferentes frecuencias diarias. Para ello se utilizaron 20 vaquillonas de raza Hereford (255 ± 22 Kg de peso vivo (PV) con catéter ruminal, alojadas de forma individual en jaulas metabólicas, las cuales fueron bloqueadas según su PV y distribuidas aleatoriamente en cuatro tratamientos. Las vaquillonas fueron alimentadas según el tratamiento con forraje *ad libitum* sin suplemento (T0), o forraje *ad libitum* y suplementadas con grano de maíz a razón de 1% de su peso vivo una (T1), dos (T2) u ocho (T8) veces al día. El forraje se cortó todos los días a la hora 11:00 y fue ofrecido a partir de la hora 12:00. Luego de 20 días de adaptación se extrajo líquido ruminal de cada vaquillona que posteriormente fue utilizado como inóculo en un ensayo de producción de gas *in vitro*. Para ello fueron utilizadas botellas de 125 ml las que contenían un medio de incubación (según Williams y col., 2005) y uno de los 3 sustratos utilizados que fueron *Medicago sativa* (MO 90,9%; PB 20,6%; FDN 32,8%), *Trifolium repens* (MO 88,9%; PB 25,2%; FDN 37,7%) y *Lolium multiflorum* (MO 88,0%; PB 9,8%; FDN 50,4%) además de 2 frascos “blanco” sin sustrato, para evaluar la actividad de fermentación mediante la técnica de producción de gas *in vitro*. Se midió la presión de gas a las 2,4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h del inicio de la incubación, estos valores fueron convertidos luego a volumen de gas. Luego fueron ajustados a un modelo exponencial y se obtuvieron los siguientes parámetros: volumen potencial de gas (a), la tasa fraccional de producción de gas (kd) y el tiempo de latencia (L). Estos parámetros fueron analizados mediante PROC MIXED de SAS (2009), teniendo en cuenta el efecto del tratamiento, el sustrato y su interacción. No se observaron diferencias significativas entre inóculos de los diferentes tratamientos en la producción potencial de gas ni en la tasa fraccional de producción de gas, así como tampoco interacción de tratamiento y sustratos para estos parámetros. Sí se encontraron diferencias significativas para el tiempo de latencia en la producción de gas entre los diferentes tratamientos ($P < 0,01$), sustratos ($P < 0,01$) y su interacción ($P < 0,01$). En base a los resultados concluimos que aumentar la frecuencia de suplementación con granos de maíz a un nivel del 1% del PV a vaquillonas alimentadas con pasturas de calidad media no tuvo efectos significativos sobre la actividad fermentativa del inóculo ruminal.

2. SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the ruminal inoculum fermentation activity in heifers fed exclusively fresh ryegrass (OM 91%, CP 9.0%; NDF 53%) and supplemented or not with dry corn grain (99% OM; CP 7% NDF 10%) offered at different daily frequencies. Twenty Hereford heifers (255 ± 22 kg of BW) with ruminal catheter were housed in metabolic cages, blocked by BW and randomly assigned to one to four treatments. Heifers were fed fresh ryegrass *ad libitum* and were not supplemented (T0) or fresh ryegrass *ad libitum* and supplemented with corn grain at 1% of bodyweight I one (T1), two (T2) or eight (T8) meals per day. Forage was cut every day at 11:00 am and offered *ad libitum* all day long until the next morning. After an adaptation period of 20 days, ruminal fluid of each heifers was used to evaluate fermentation activity by *in vitro* gas production technique. The inoculum was incubated at 39° C in different bottles containing 125 ml of incubation medium (according to Williams et al., 2005) and one of the 3 substrates used which were *Medicago sativa* (OM 90.9% CP 20.6%, NDF 32.8%), *Trifolium repens* (OM 88.9% CP 25.2%; FDN 37.7%), *Lolium multiflorum* (OM 88.0% 9.8% CP; FDN 50.4%) and 2 bottles without substrate (blank), to evaluate the fermentation activity through *in vitro* gas production technique. Gas pressure was measured at 2.4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 h since the beginning of incubation and these data were converted to gas volume. They were then fitted to an exponential model and potential gas volume, the fractional rate of gas production and *lag* were analyzed by PROC MIXED, considering the effect of treatment and substrate and their interaction. No significant differences were observed between inoculum of different treatments in the potential of gas production (a) or fractional gas production rate (kd) or the interaction of treatment and substrates for these parameters. Differences were found in the *lag* time between treatments (P <0.01), substrates (P <0.01) and their interaction (P <0.01). According to these results, it is concluded that an increase in the frequency of supplementation with corn supplemented at 1% of the body weight in heifers fed medium quality fresh forage had no significant effect on the activity of ruminal inoculum.

3. INTRODUCCIÓN

La suplementación estratégica de rumiantes con concentrados es muy utilizada en los sistemas ganaderos pastoriles como herramienta para mejorar el desempeño animal, la productividad por hectárea (Rearte y Santini 1989; Elizalde y Santini 1992), corregir posibles deficiencias de las pasturas, mantener la carga animal a lo largo del año (Pigurina, 2000) y mejorar el aprovechamiento de los recursos forrajeros disponibles (Bargo y col., 2003).

En animales cuya dieta se basa en forrajes, la suplementación con granos que aportan carbohidratos de rápida fermentación genera efectos asociativos a nivel ruminal que pueden ser positivos o negativos, dependiendo si aumentan o disminuyen el consumo de nutrientes y el aprovechamiento digestivo de la dieta (Dixon y Stockdale 1999). En este sentido algunos estudios de suplementación han reportado efectos asociativos negativos cuando se incorporan granos a la dieta de rumiantes. Los efectos asociativos negativos ocurren por una rápida fermentación de los carbohidratos, generando un aumento en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), una caída brusca del pH ruminal, resultando en una menor digestibilidad de la fibra de la dieta por una menor actividad fermentativa de la población microbiana fibrolítica (Dixon y Stockdale, 1999). A mayor proporción de concentraos en la dieta de los rumiantes, más agudos y marcados son estos cambios (Aguerre y col., 2013).

Es por ello que se han estudiado propuestas que aumentan el consumo de nutrientes sin afectar el aprovechamiento digestivo de los forrajes y de la dieta total. La suplementación en diferentes frecuencias diarias en animales que se alimentan de forrajes resulta una muy buena herramienta de manejo de la alimentación logrando reducir o eliminar posibles efectos asociativos negativos gracias a una actividad fermentativa ruminal más estable (Aronen, 1991; Soto-Navarro y col., 2000; Robles y col., 2007). Esta estabilidad responde a menores fluctuaciones del pH ruminal (Kaufmann, 1976; Aronen, 1991; Robles y col., 2007), a concentraciones postprandial menores y más estables del nitrógeno amoniacal (N-NH₃) (Yang y Varga, 1989), lo que permiten a su vez sincronizar el aporte de carbohidratos con la degradación proteica del forraje (Rearte y Pieroni, 2001). Observándose mayores ganancias diarias de peso en animales de carne (Gibson, 1981) y una mayor producción en vacas lecheras (Gibson, 1984; Yang y Varga 1989).

A nivel internacional se han realizado experimentos de frecuencias de alimentación y de frecuencias de suministro del concentrado, en los que se han estudiado tanto sus efectos a nivel digestivo como productivo expresados en términos de ganancia de peso vivo y producción de leche (Yang y Varga 1989; Aronen, 1991; Soto-Navarro y col., 2000; Robles y col., 2007). Sin embargo hemos encontrado muy pocos trabajos de frecuencias de alimentación o frecuencias de suministro del concentrado que evalúen la actividad fermentativa ruminal.

En este trabajo se evaluará si la suplementación y la frecuencia de suplementación producen cambios sobre la actividad fermentativa de la biomasa microbiana y su capacidad para fermentar distintos forrajes, lo que contribuirá a la información ya existente para establecer si es necesario el fraccionamiento diario del concentrado al suplementar bovinos y aportar explicaciones a los procesos observados en experimentos *in vivo*.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Ambiente ruminal y actividad fermentativa en bovinos.

Los alimentos ingeridos por los rumiantes sufren una primera fermentación por los microorganismos (m.o.) en el retículo-rumen, una hidrólisis ácida y degradación enzimática en abomaso e intestino delgado, y una segunda fermentación en ciego e intestino grueso (Merchen y col., 1997).

Los rumiantes poseen un sistema de fermentación de los alimentos por parte de m.o. ruminales previo a la acción de las propias enzimas digestivas (Owens y Goetsch, 1988). Estos m.o. ruminales son los responsables de la degradación de los alimentos consumidos y formación de sustancias aprovechables por el rumiante como ácidos orgánicos, gases y $N-NH_3$ (Calsamiglia y Ferret, 2002; Kozloski, 2002). De esta manera la estrategia alimentaria de los rumiantes se basa en la simbiosis entre los m.o. ruminales y el huésped (McDonald y col., 2006) para obtener energía de alimentos fibrosos de manera más eficiente que la que logran la mayoría de los herbívoros (Van Soest, 1994). El grado y el tipo de transformación de los alimentos en el rumen determinan el rendimiento productivo del animal (Mackie y White, 1990).

El retículo-rumen proporciona un sistema de cultivo continuo favorable para la fermentación de los m.o. ruminales. Algunas de las características que lo hacen posible son: un ambiente cercano a la anaerobiosis, gracias al rápido consumo de oxígeno que ingresa, un pH cercano a la neutralidad (6,2 - 7,0) y una temperatura estable entre 38 y 42°C (McDonald y col., 2006). Según Calsamiglia y Ferret (2002), así como Kamra (2005), de todos los factores del medio ruminal el pH es el más susceptible a variaciones. Esta variación va a depender del equilibrio entre la producción de ácidos en el proceso de fermentación, la rapidez de absorción de los mismos y de la secreción de saliva que aporta tanto fosfatos como bicarbonato que actúan como tampones (McDonald y col., 2006; Zebeli y col., 2010).

La microbiota del rumen es la responsable de la fermentación y de la gran eficiencia de los rumiantes para utilizar una variada gama de alimentos. Esta es a su vez es muy diversificada, compuesta por bacterias (10^{10} - 10^{11} células/ml de líquido ruminal), protozoos (10^5 - 10^6 células/ml de líquido ruminal), hongos (10^3 - 10^5 zoosporas/ml de líquido ruminal), arqueas (10^7 - 10^9 células/ml de líquido ruminal) y bacteriófagos (5×10^7 fagos/ml de líquido ruminal) (Church, 1993).

Según Kamra (2005) esta población microbiana es estable y dinámica al mismo tiempo, siendo estable porque está establecida y ha llevado a cabo la función de bio-conversión del alimento en AGV; y dinámica ya que cambia de forma considerable con el cambio de la dieta. Se ha observado que el número y proporciones relativas de las distintas especies que habitan en el rumen están influenciadas principalmente por la dieta del animal (Yokohama y Johnson, 1988).

También, al variar la dieta y la microbiota ruminal, varían los productos finales de la fermentación. Por ejemplo: las dietas a base de forraje, ricas en celulosa, estimulan la acción de las bacterias celulolíticas que producen principalmente ácido acético, mientras que dietas ricas en almidón estimulan la actividad de las bacterias amilolíticas que producen una mayor proporción de ácido propiónico (Owens y Goetsch, 1988; Kaufmann y Saelzer, 1980).

En general la alimentación de los rumiantes se basa principalmente en forrajes, los cuales contienen altos porcentaje de carbohidratos estructurales en su composición (McDonald y

col., 2006). Los carbohidratos, proteínas y lípidos consumidos deben ser divididos hasta formas monómeras para su aprovechamiento (Owens y Goetsch, 1988).

Los carbohidratos se clasifican en: por un lado, monosacáridos y por otro lado polisacáridos, los cuales a su vez se dividen en estructurales (celulosa, hemicelulosa) y no estructurales (almidón y azúcares solubles, pectinas). Los polisacáridos estructurales representan la mayor parte de la membrana celular vegetal siendo la celulosa la más abundante. La pectina es altamente soluble y de rápida fermentación ruminal, mientras que la celulosa y hemicelulosa, dependiendo del estado de madurez del forraje, se encuentran ligados a una sustancia fenólica llamada lignina, retardando el acceso de los m.o. a los carbohidratos y por lo tanto su fermentación (Church, 1993).

La mayor parte de los carbohidratos del alimento son fermentados dando lugar a la producción de AGV principalmente de cadena corta como los ácidos acético, propiónico y butírico, teniendo al piruvato como principal producto intermedio del metabolismo microbiano (Rearte, 1992; Van Soest, 1994). Estos AGV resultan como productos secundarios de la fermentación ruminal para los m.o., pero para el rumiante son la principal fuente de energía.

La concentración de ruminal de AGV varía de 70 a 130 mmol/l (Bergman, 1990). La cantidad y perfiles de estos AGV dependen de la dieta (Annison y Lewis, 1966), del tipo y cantidad de carbohidratos ingeridos con el alimento y la estructura física de este. La fermentación ruminal de forrajes fibrosos en estado avanzado de maduración, con un alto contenido de celulosa y lignina, genera perfiles de AGV con una mayor concentración de ácido acético, mientras que los forrajes en un estado más temprano de maduración tienden a producir menos ácido acético y mayor proporción de ácido propiónico (Church, 1993). En la medida que disminuye el tamaño de las partículas del alimento, se produce una modificación similar en la relación acético/propiónico aunque también aumenta la proporción del ácido butírico (Maynard y col., 1981).

Dietas ricas en carbohidratos no estructurales (almidón) producen una concentración mayor de AGV (Balch y Rowland, 1957), favoreciendo la formación del ácido propiónico y cierto incremento del ácido butírico (Church, 1993). La adición de concentrados a una dieta forrajera causa una disminución en la concentración de ácido acético, aumentando la del ácido propiónico principalmente (Zabaleta de Lucio, 1976; Maynard y col., 1981). Sin embargo la suplementación con alimentos ricos en almidón (concentrados) a menudo disminuyen el consumo de forraje y la digestibilidad de la fibra (Paterson y col., 1994). Por lo tanto en la formulación de dietas para los rumiantes se debe buscar el equilibrio entre los niveles de carbohidratos fibrosos (estructurales) y no fibrosos (no estructurales) con el objetivo de optimizar la ingestión de energía sin provocar alteraciones patológicas en el rumen (Calsamiglia y Ferret, 2002).

La degradación de las proteínas del alimento es un proceso enzimático realizado por proteasas de origen microbiano (fundamentalmente bacteriano y una menor proporción proveniente de protozoos) (McDonald y col., 2006), hasta convertirlos en péptidos, AA, amoníaco (NH_3), ácidos orgánicos y CO_2 (Bach y col., 2005).

Los m.o. ruminales pueden absorber pequeños péptidos y AA, descomponerlos en NH_3 y ácidos orgánicos, o utilizarlos para la síntesis de proteína microbiana. El N-NH_3 también puede originarse de la descomposición (por parte de enzimas de origen microbiano) del nitrógeno no proteico exógeno ingresado al rumen con la dieta (urea) o de origen endógeno

que llega al rumen con la saliva o por difusión directa por la pared del rumen (Kozloski, 2011).

Una de las principales determinantes en la síntesis de proteína microbiana es la disponibilidad ruminal de sustratos energéticos, es por ello que la utilización de concentrados energéticos ricos en carbohidratos rápidamente fermentescibles hace más eficiente la captura de nitrógeno (N) a nivel ruminal proveniente de las pasturas (Van Soest y col., 1991). Además, dichos nutrientes deben estar disponibles en forma sincrónica (Valkeners y col., 2006). Según Huntington (1997) la baja disponibilidad de energía o la falta de sincronía entre ella y el suministro de N, limitan el uso del N disponible por parte de los m.o.

La proteína microbiana representa la fuente más abundante de proteína que llega al duodeno, la cual es altamente digestible y de una excelente calidad debido al perfil de AA que suministra (Stern y col., 1994; Schingoethe, 1996).

Se ha sugerido que las condiciones ruminales óptimas para la degradación de los carbohidratos y la síntesis de proteína microbiana están caracterizados por un pH cercano a la neutralidad (6.7-6.8), una concentración de NH_3 de al menos 5-8 mg/dl y de AGV de 75-90 mmol/l, con una relación acético/propiónico de 3,5/1 (Kaufmann y col., 1980; Rearte, 1992; Van Soest, 1994).

4.2. Suplementación de rumiantes.

El consumo de materia seca (MS), la cantidad de nutrientes digestibles en la misma y la eficiencia con la que estos son utilizados por la flora microbiana y por el animal, determinan la productividad del rumiante (Rearte y Santini, 1989). En los sistemas de producción donde los animales se alimentan de forraje fresco a través del pastoreo directo, tal como ocurre en la gran mayoría de los sistemas ganaderos de nuestro país, la suplementación con concentrados ha sido una herramienta muy utilizada. La misma busca principalmente cubrir deficiencias tanto cuali como cuantitativas de los recursos forrajeros para optimizar la productividad individual de los animales y por unidad de superficie a lo largo del año o en momentos estratégicos (Elizalde y Santini, 1992; Bowman y Sanson, 1996; Reis y col., 2009).

La suplementación puede ser energética o proteica, pero según Bargo y col. (2002) y en acuerdo con un trabajo realizado por Repetto y col. (2001) en estos sistemas basados en el consumo de pasturas templadas implantadas la proteína no sería una limitante nutricional aunque si la energía. En estas situaciones el suplemento deberá aportar carbohidratos de rápida degradación, por lo que los granos de cereales y algunos subproductos son adecuados para la suplementación (Cajarville y Repetto, 2013).

Los granos de cereales son utilizados como suplementos energéticos los cuales poseen altos contenido de almidón, de hasta un 72% y son clasificados en de rápida (trigo y cebada) y de lenta degradación (maíz, sorgo) (Offner y col, 2003). El grano de maíz un cereal de alto valor energético, con un alto contenido de almidón (63-65%) de lenta degradación y con un bajo contenido de FND (8-9%). Esta FND está compuesta por celulosa y pentosas con un bajo contenido de lignina (Offner y col, 2003; Repetto y col, 2003).

La suplementación genera efectos sobre el consumo voluntario de forraje, en este sentido Lange (1980) ha clasificado el tipo de respuesta de la suplementación sobre el consumo en:

efecto de adición, donde el consumo de suplemento se suma al consumo de forraje sin ser afectado, incrementando el consumo total de MS. Efecto de sustitución el cual hace que el consumo de forraje disminuya a medida que aumenta el consumo de concentrado, pudiendo mantenerse o aumentar el consumo total de MS. El efecto de adición con sustitución ocurre cuando la cantidad de forraje consumido disminuye pero el consumo total de MS aumenta a expensas del concentrado. Existen también el efecto de adición con estímulo que sucede cuando el concentrado causa un aumento en la ingestión de forraje (aumentando el consumo total de MS), y el efecto de sustitución con depresión ocurre cuando el consumo de forraje disminuye de tal forma que también disminuye el consumo total de MS.

Normalmente lo que más afecta la ingesta de nutrientes cuando los animales suplementados consumen forrajes de alta calidad es la tasa de sustitución, sin embargo cuando los animales suplementados consumen forrajes de baja calidad lo que más afecta la ingesta de nutrientes es la depresión de la digestión de la fibra (Elizalde y col, 1999).

Dos factores influyen en la ingesta de nutrientes cuando los bovinos en pastoreo son suplementados con concentrados: la sustitución del consumo de forraje por concentrado y la depresión sobre la digestión de la fibra. Elizalde y Santini, (1992) sostienen que el objetivo de la suplementación con alimentos ricos en energía es lograr una sustitución parcial del forraje fresco aumentando el consumo total de MS, es decir una respuesta de sustitución con adición en el consumo total de MS.

4.3. Producción de gas *in vitro*.

Las características de fermentación de los alimentos en el rumen pueden ser estudiadas por métodos *in vivo* o *in vitro* (Van Soest, 1994). Las técnicas de fermentación *in vitro* se desarrollaron con el propósito de evaluar los alimentos de manera menos costosa, más rápida y con un número menor de animales (Mould y col., 2005).

La técnica de producción de gas *in vitro*, en la que los alimentos son incubados con buffer y líquido ruminal, permite determinar la magnitud y cinética de fermentación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou y col., 1994). El gas producido se mide como un indicador indirecto de la cinética de fermentación (Rymer y col., 2005). En general en la técnica de producción de gas *in vitro* se utilizan sustratos molidos, un medio anaeróbico, buffer, inóculo ruminal (conteniendo m.o. viables) y temperatura de incubación de 39°C (Williams, 2000).

Existen métodos manuales, semiautomáticos o totalmente automáticos para medir la producción de gas en valores de presión, y el volumen constante (en ml), con transductores o sensores (Rymer y col., 2005). Estas técnicas se puede utilizar para la evaluación de los alimentos, para investigar mecanismos de fermentación microbiana y para estudiar el modo de acción de los factores anti-nutritivos, aditivos y suplementos alimenticios (López y col., 2007).

Las principales ventajas de la técnica de producción de gas están dadas por el bienestar animal, el tamaño de la muestra, el costo y la descripción de la cinética de fermentación (Mould y col., 2005).

El análisis de los datos obtenidos a partir de esta técnica se basa en modelos matemáticos para estimar el índice y grado de digestión acumulativa de los alimentos a partir de la producción de gas (López y col., 2007). Las curvas de producción de gas pueden ser ajustadas a diferentes modelos matemáticos. Los mejores modelos son aquellos que presentan el mejor balance entre la capacidad de ajuste de los datos y la coherencia biológica, siendo necesaria su evaluación en las más variadas condiciones experimentales a fin de escoger el mejor para cada sistema (Posada y Noguera, 2007).

Uno de los modelos más utilizado es el exponencial simple con tiempo de latencia, el cual supone que la tasa de producción de gas es constante y que depende del sustrato disponible una vez alcanzado el tiempo de colonización. Durante la fase inicial ocurre la hidratación y colonización del sustrato insoluble por los m.o. ruminales. Luego cuando el sustrato es saturado por los m.o. ruminales y enzimas ocurre la fase exponencial, donde se degrada primero la parte más degradable del sustrato y el sustrato menos degradable precisa de más tiempo para ser degradado. Finalmente cuando la fracción potencialmente degradable ha sido digerida, la producción de gas es cero (Posada y Noguera, 2007).

Como desventaja se menciona la falta de uniformidad en las metodologías, lo que dificulta la comparación de resultados entre grupos de investigación (Williams, 2000). Según Rymer y col. (2005) algunos de los efectos que dificultan la comparación entre grupos de investigación son: cambios en la presión atmosférica afectada por la altitud, la agitación del medio, tamaño de la muestra y su preparación, tipos de inóculos, efecto del uso de blancos, composición del medio de cultivo, efecto de los tipos de aparatos utilizados y los diferentes sistemas de evaluación.

Sin embargo, la fuente de variación más importante es el origen del inóculo. La actividad de la microbiota presente en el inóculo tiene mayor influencia que el sustrato sobre la producción de gas (Rymer y col., 2005), es por esto que la producción de gas *in vitro* puede ser utilizada para evaluar la actividad fermentativa de diferentes inóculos provenientes de animales sometidos a diferentes tratamientos nutricionales tal como es el caso del presente trabajo.

5. HIPÓTESIS

El fraccionamiento del suministro del concentrado a vaquillonas alimentadas *ad libitum* con forraje fresco permitirá atenuar los efectos negativos de la suplementación sobre la actividad fermentativa de los inóculos ruminales frente a distintos forrajes.

6. OBJETIVO

Evaluar, mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, la actividad fermentativa de inóculos ruminales de vaquillonas que consumen forraje fresco *ad libitum* como único alimento o forraje *ad libitum* y grano de maíz a razón de 1% de su PV suministrado a diferentes frecuencias diarias.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo experimental a campo y procesamiento primario de las muestras fue realizado en el Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, Libertad (San José, Uruguay). Los análisis de composición química se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay). Todos los procedimientos con los animales fueron realizados de acuerdo al protocolo experimental aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (CEUAFVET - PI 11).

7.1. Animales y tratamientos

Se utilizaron 20 vaquillonas Hereford de 255 ± 22 Kg de PV, de 18 meses de edad, las cuales fueron alojadas individualmente en jaulas metabólicas, bloqueadas por PV y luego asignadas al azar a uno de los 4 tratamientos.

Los animales consumieron forraje *ad libitum*, el cual fue cortado con pastera a una altura de 10 cm del suelo de una parcela seleccionada. El mismo estaba compuesto en un 98,5% por raigrás (*Lolium Multiflorum*) y 1,5% de trébol blanco (*Trifolium repens*), ambos en estado vegetativo.

Los tratamientos consistieron en:

- T0: pastura *ad libitum*.
- T1: pastura *ad libitum* + grano de maíz a razón de 1% PV una vez al día (hora 09:00).
- T2: pastura *ad libitum* + grano de maíz a razón de 1% PV, fraccionado en dos veces al día (hora 09:00 y 21:00).
- T8: pastura *ad libitum* + grano de maíz a razón de 1% PV, fraccionado en ocho veces al día (hora 09:00, 10:30, 12:00, 13:30, 15:00, 16:30, 18:00 y 19:30).

La pastura se cortó diariamente a la misma hora (hora 11:00) para todos los tratamientos y fue administrada *ad libitum* a partir de la hora 12:00. El forraje sobrante de cada día fue desechado al día siguiente luego del siguiente corte. El agua de bebida también fue suministrada *ad libitum* durante todo el experimento.

Cuadro I. Composición química de los alimentos utilizados (media \pm DE)

Alimento	MS (%)	MO (% MS)	PB (% MS)	FND (% MS)	FAD (% MS)	EE (% MS)
Forraje ^a	24 \pm 1,4	91 \pm 0,1	9 \pm 0,8	53 \pm 6,2	35 \pm 7,9	2,2 \pm 0,23
Suplemento ^b	82 \pm 0,2	99 \pm 0,5	7 \pm 0,2	10 \pm 0,5	3 \pm 0,4	4,0 \pm 0,31

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; EE: extracto etéreo.

^a Compuesto por: *Lolium multiflorum* (98,5%) y *Trifolium repens* (1,5%).

^b Grano de maíz seco y molido (*Zea mays*).

El ensayo tuvo un período de adaptación de las vaquillonas a la dieta y a las condiciones experimentales de 20 días de duración. Previo a ese período se le implantó quirúrgicamente a

cada vaquillona un catéter ruminal por el flanco izquierdo, para la extracción de líquido ruminal.

Terminado el periodo de adaptación, se le extrajo líquido ruminal a cada vaquillona en forma individual para evaluar la actividad fermentativa de los inóculos mediante la técnica de producción de gas *in vitro* que se describe a continuación.

7.2. Producción de gas *in vitro*.

Para la determinación de la producción de gas *in vitro* se utilizó como modelo el procedimiento descrito por Mauricio y col. (1999).

Se utilizó como inóculo el líquido ruminal fresco de cada una de las vaquillonas sometidas a los diferentes tratamientos, el cual se recogió a la hora 15:00 (6 horas después del primer suministro del concentrado, en ese momento las vaquillonas del T2 y T8 ya habían consumido la mitad de las asignaciones diarias del concentrado). El líquido ruminal de cada vaquillona se incubó en 5 botellas de vidrio de 125 ml junto con uno de los 3 forrajes (*Medicago sativa*, *Trifolium repens* o *Lolium multiflorum*) como sustrato (cuadro II). Además se incubaron 2 botellas “blanco” por animal, a los cuales no se les agregó ningún sustrato. Por lo tanto, cada tratamiento tuvo un total de 25 botellas.

Cuadro II. Composición química de los sustratos utilizados en la técnica de producción de gas *in vitro*

Alimento	MS (%)	MO (% MS)	PB (% MS)	FND (% MS)	EE (% MS)
Trébol Blanco	13±0,01	90±0,3	25±0,8	38±0,5	4±0,13
Alfalfa	19±0,01	91±0,1	21±0,6	33±0,3	3±0,01
Raigrás	18±0,01	89±0,2	10±0,8	50±0,8	3±0,08

El día previo al agregado del líquido ruminal, se introdujo en las botellas de vidrio, 0,5 g de MS de cada sustrato (seco y molido a un tamaño de 1 mm) y se le adicionó 38 ml de solución basal libre de N, 2 ml de solución buffer y 0,5 ml de solución reductora de acuerdo a Williams y col. (2005) (Cuadro III). Inmediatamente después las botellas se saturaron con CO₂, se taparon y almacenaron durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, previo a la inoculación fueron precalentadas en un baño maría hasta alcanzar la temperatura de incubación (39°C).

El líquido ruminal fue extraído a través de los catéteres de las vaquillonas de cada tratamiento. En el momento de la inoculación se agregó a cada botella 10 ml del líquido ruminal fresco, se saturaron nuevamente con CO₂, se taparon con tapón de goma y sellaron herméticamente con precinto de aluminio.

Las botellas fueron colocadas en baño maría (39°C) donde permanecieron durante el periodo de incubación (96 horas).

Cuadro III. Composición de las soluciones utilizadas en el medio de incubación para la producción de gas *in vitro* (Williams y col., 2005).

a) SOLUCIÓN BASAL LIBRE DE N (g/l de agua destilada)	
KCl	0,60
NaCl	0,60
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,20
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
KH ₂ PO ₄	1,46
Na ₂ HPO ₄	3,55
<u>Solución minerales traza (g/l de HCl 0,02 molar) 10 ml por litro de Solución basal</u>	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
ZnCl ₂	0,03
CuCl ₂ .H ₂ O	0,03
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,05
SeO ₂	5,00
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
NaVO ₃	0,03
H ₃ BO ₃	0,25
<u>Solución hemina (g/l de agua destilada) 10 ml por litro de solución basal</u>	
Hemina	0,10
b) Solución reductora (g/l de agua destilada)	
Na ₂ S.9H ₂ O	20,50
c) Solución Buffer (g/l de agua destilada)	
Na ₂ CO ₃	82,00

La presión de gas expresada en psi (libras por pulgada cuadrada) se midió con un manómetro digital (RZ-6860 a -00, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EE.UU.), y se registraron los valores a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas desde el inicio de la incubación. Una vez realizada cada medición, se vació la presión interna de cada botella, se agitaron y devolvieron al baño maría hasta la próxima hora de medición.

Los registros de presión (psi) fueron transformados a volumen (V) mediante una ecuación de regresión ($R^2 = 0,998$) obtenida en un experimento anterior:

$$V = 4,40 P + 0,09 P^2$$

Donde “V” es el volumen de gas en ml.

Los volúmenes de gas obtenidos a partir de cada botella fueron ajustados a un modelo exponencial simple con latencia (*lag*):

$$V = a [1 - e^{-kd(t-L)}]$$

Donde “V” es el volumen de gas (ml) en el tiempo “t” (horas), “a” es la producción potencial de gas (ml/g de MO incubada), “kd” es la tasa fraccional de producción de gas (ml/h) y “L” es el tiempo de latencia (h).

7.3. Análisis estadísticos

Los parámetros “*a*”, “*kd*” y “*L*” se analizaron por PROC MIXED (SAS, 2002), teniendo en cuenta el efecto fijo del tratamiento (T), del sustrato (S), y la interacción entre “T” × “S” de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + (T \times S)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Las medidas se compararon con el test de Tukey y se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$ y tendencias cuando $0,05 < P < 0,10$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferentes frecuencias de suplementación no afectaron el volumen ni la velocidad de producción de gas (Cuadro IV).

Cuadro IV. Efecto de la suplementación y la frecuencia de suministro de maíz sobre la actividad fermentativa de los inóculos ruminales de vaquillonas de carne para fermentar distintos forrajes incubados en un ensayo de producción de gas *in vitro*.

Parámetro	Tratamiento ^A				EEM ^B	P ^C		
	T0	T1	T2	T8		T	S	T×S
<i>a</i>	218	217	219	230	40,0	0,36	<0,01	0,60
<i>Kd</i>	5,0	5,7	5,5	4,6	0,45	0,45	0,05	0,27
<i>L</i>	0,7 ^b	0,4 ^b	1,5 ^a	1,9 ^a	1,06	<0,01	0,01	<0,01

^A T0: pastura *ad libitum* sin suplementación; T1, T2, T8: pastura *ad libitum* y suplementación con grano de maíz seco y molido a razón de 1% del PV en una, dos u ocho veces al día respectivamente.

^B Error estándar de la media (n=5).

^C Nivel de significancia.

a: Producción potencial de gas (ml de gas/g de MO incubada).

Kd: Tasa fraccional de producción de gas (ml/h).

L: Tiempo de latencia (h).

^{a,b}: indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre los valores de *L* de los diferentes tratamientos.

No se detectaron efectos del tratamiento sobre la producción potencial de gas ni en la tasa fraccional de producción de gas, así como tampoco se detectó interacción de tratamiento por sustratos para estos parámetros.

El efecto sustrato observado para estas variables se puede explicar por la diferencia entre los distintos tipos de forrajes (gramíneas vs. leguminosas) y a las diferencias en sus composiciones químicas (ver cuadro II). El raigrás fue el sustrato que tuvo numéricamente una mayor producción potencial de gas, siendo significativamente superior al trébol blanco y a la alfalfa (P<0,01). Este hecho resulta llamativo debido al mayor contenido de fibra del raigrás en comparación a los demás sustratos (ver Cuadro II), sin embargo el acostumbramiento de los m.o. ruminales al forraje de la dieta base de las vaquillonas (similar al raigrás incubado) puede explicar este resultado. Se observó una tendencia (P=0,05) en la tasa fraccional de producción de gas de acuerdo al sustrato empleado. En este caso la alfalfa tuvieron una mayor velocidad de producción de gas que el raigrás independientemente del tratamiento.

A pesar de esto en este ensayo el efecto sustrato no cobra importancia ya que el objetivo fue evaluar la actividad del inóculo ruminal según el tratamiento aplicado y no sobre un sustrato en particular. A pesar de que en el presente ensayo el objetivo fue evaluar la actividad del inóculo ruminal según el tratamiento aplicado y no sobre un sustrato en particular, el efecto

sustrato cobra cierta importancia ya que existieron diferencias significativas en los tres parámetros estudiados.

Por el contrario, si se encontraron diferencias significativas para el tiempo de latencia en la producción de gas entre los diferentes tratamientos ($P < 0,01$), sustratos ($P = 0,01$) y para su interacción ($P < 0,01$). Cuando analizamos la interacción entre tratamiento y sustrato, se observa efecto del tratamiento sobre el tiempo de latencia cuando el Raigrás fue el sustrato utilizado. En este caso el tiempo de latencia fue menor para T0 y T1 en comparación a T2 y T8.

Mould y Orskov (1983), así como Calsamiglia y col. (2008) observaron que hay efectos en el rumen dependientes del tipo del sustrato fermentado y lo llamaron “*Efecto Carbohidrato*”, donde la degradación de la fibra y perfil de fermentación en rumen cambia cuando adicionamos concentrados independientemente de los cambios de pH. En este sentido varios estudios han demostrado que la suplementación con alimentos ricos en almidón deprime la degradación ruminal de la fibra, incluso en situaciones en la que no hay una reducción significativa en el pH ruminal (Grant y Mertens, 1992; Mould y Orskov, 1983; Mould y col., 1983). La degradación del forraje depende principalmente de la adherencia microbiana a las partículas de alimento (McAllister y col. 1994), por lo tanto el efecto de los carbohidratos disminuyendo la degradación de la fibra es debida probablemente a la inhibición directa o indirecta de la adherencia bacteriana a los alimentos.

Aronen (1991) estudio la fermentación ruminal en animales en crecimiento según la frecuencia de suplementación y observo un tiempo de latencia más corto de la degradación del forraje para los animales suplementados una sola vez al día comparado con los suplementados dos veces al día. Esto podría ser debido a condiciones más favorables para los m.o. celulolíticos para iniciar la degradación ruminal de la fibra.

Cabe aclarar que en el presente estudio se utilizó un forraje de calidad media y que se utilizaron cantidades moderadas de concentrado para la suplementación (25% de la MS total consumida), lo cual no fue suficiente para causar cambios importantes a nivel ruminal (Huelmo y col., 2015), lo que lleva a que no se encontraran diferencias significativas entre los inóculos de los diferentes tratamientos.

Es posible que los resultados pudieran haber diferido si se hubiera utilizado forrajes de mayor calidad o si la cantidad de concentrados en la dieta hubiera sido mayor (superior a 1% del PV).

9. CONCLUSIONES

En situaciones donde los bovinos son alimentados con pasturas de calidad media y suplementadas con grano de maíz a razón de 1% del PV, no sería necesario el fraccionamiento del concentrado a lo largo del día, ya que el suministro del concentrado una sola vez al día no genera efectos negativos significativos sobre la actividad fermentativa ruminal.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguerre, M., Cajarville, C., Kozloski, G.V., Repetto, J.L. (2013). Intake and digestive responses by ruminants fed fresh temperate pasture supplemented with increased levels of sorghum grain: A comparison between cattle and sheep. *Animals Feed Science and Technology*, 186:12-19.
2. Annison, E.F., Lewis, D. (1966). *El metabolismo en el rumen*. México, Hispano Americana, 200 p.
3. Aronen, I. (1991). Influence of frequency and accuracy of supplement feeding on rumen fermentation, feed intake, diet digestion and performance of growing cattle. 1. Studies with growing bulls fed grass silage ad libitum. *Animal Feed Science and Technology*, 34: 42-65.
4. Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 88:9-21.
5. Balch, D.A., Rowland, S.J. (1957). Volatile fatty acids and lactic acid in the rumen of dairy cows receiving a variety of diets. *British Journal of Nutrition*, 11:288-298.
6. Bargo, F., Muller, L.D., Kolver, E.S., Delahoy, J.E. (2003). Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science*, 86:1-42.
7. Bargo, F., Muller, L.D., Varga, G.A., Delahoy, J.E., y Cassidy, T.W. (2002). La digestión ruminal y la fermentación de las vacas lecheras de alta producción con tres sistemas de alimentación, donde se combinaron los pastos y las raciones mixtas totales. *Journal of Dairy Science*, 85:2964-2973.
8. Bergman, E.N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70:567-590.
9. Bowman, J.G.; Sanson, D.W. (1996). Starch-or fiber-based energy supplements for grazing ruminants. *Proceedings. Western Section. American Society of Animal Science*, 47:118-135.
10. Cajarville, C., Repetto, J.L. (2013). Uso de concentrados para optimizar el aprovechamiento digestivo de las paturas. Disponible en: <https://www.engormix.com/MAGanaderia-carne/nutricion/articulos/uso-concentrados-optimizar-aprovechamiento-t4667/141-p0.htm>. Fecha de consulta: 01/03/2016.
11. Calsamiglia, S., Ferret, A. (2002) Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. XVIII Curso de especialización FEDNA. Barcelona, España. p. 97-115.

12. Church, C.D. (1993). *El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición*. Zaragoza, Acribia, 641p.
13. Dixon, D.M., Stockdale, C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilisation. *Australian Journal of Agricultural Research* 50:757-774.
14. Elizalde, J.C., Merchen, N.R., Faulkner, D.B. (1999). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: I. Effects on digestion of organic matter, fiber, and starch. *Journal of Animal Science*, 77:457-466.
15. Elizalde, J.C., Santini, F.J. (1992). Factores nutricionales que limitan las ganancias de peso en bovinos durante el periodo otoño-invierno. *Boletín Técnico, EEA INTA Balcarce*, 104:1-27.
16. Gibson, J.P. (1984). The effects of frequency of feeding on milk production of dairy cattle: an analysis of published results. *Animal Production*. 38:181-189.
17. Gibson, J.P. (1981). The effects of feeding frequency on the growth and efficiency of food utilization of ruminants: an analysis of published results. *Animal Science*, 32:275-283.
18. Grant, R.J., Mertens, D.R. (1992). Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *Journal of Dairy Science*, 75:2762-2768.
19. Huelmo, J.I., Zamora, C.S., Zamora, R. (2015). Efectos de la frecuencia diaria de suplementación sobre el ambiente ruminal de vaquillonas alimentadas en base a una forraje templado maduro. Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, Udelar. 23 p.
20. Huntington, G.B. (1997). Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *Journal of Animal Science*, 75:852-867.
21. Kamra, D.N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89:124-135.
22. Kaufmann, W., Saelzer, V. (1980). *Fisiología digestiva aplicada al ganado vacuno*. Zaragoza, Acribia. 85p.
23. Kaufmann, W. (1976). Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH-regulation in the rumen and on feed in-take in ruminants. *Livestock Production Science*, 3:103-114.
24. Kozloski, G. V., Hentz, F. (2011). Nutritional potential of tannin extracts for ruminants. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 19:11-12.
25. Kozloski, G. (2002). *Bioquímica dos Rumiantes*. Santa María, UFSM, 140p.

26. Lange, A. (1980). Suplementación de pasturas para la producción de carnes. AACREA, Colección Investigación Aplicada. p. 74.
27. López, S., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., France, J. (2007). Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 135:139-156.
28. Mackie, R.I., White, B.A. (1990). Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *Journal of Dairy Science*, 73:2971-2995.
29. Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K. (1999). A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, 79:321-330.
30. Maynard, L.A., Loosli, J.K., Hintz, H.F., Warner, R.G. (1981). *Nutrición Animal*, 4a ed. Mexico, Mc Graw Hill, 640p.
31. McAllister, T.A., Bae, H.D., Jones, G.A. & Cheng, K.J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science* 72:3004-3018.
32. McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A. (2006). *Nutrición Animal*, 6ª. ed. Zaragoza. Acribia. 587 p.
33. Merchen, N.R., Elizalde, J.C., Drackley, J.K. (1997). Current perspective on assessing site of digestion in ruminants. *Journal of Animal Science*, 75:2223-2234.
34. Mould, F.L., Kilem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M. (2005). In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, 123:31-50.
35. Mould, F.L., Ørskov, E.R., Mann, S.O. (1983). Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Animal Feed Science and Technology*, 10:15-30.
36. Mould, F.L., Ørskov, E.R. (1983). Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Animal Feed Science and Technology*, 10:1-14.
37. Offner, A., Bach, A., Sauvant, D. (2003). Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 106:81-93.
38. Owens, F.N., Goetsch, A.L. (1988). Fermentación ruminal. En: Church, D.C. *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*. Zaragoza, Acribia. p.159-189.
39. Paterson, J.A., Belyea, R.L., Bowman, J.P., Kerley, M.S., Williamscol, J.E. (1994). The impact of forage quality and supplementation régime on ruminant animal intake and

- performance. En: Fahey, J.R. Forage quality, evaluation, and utilization. Madison: ASA, p. 564-612.
40. Pigurina, G (2000) Los sistemas de producción de carne en Uruguay. Disponible en: <http://www.delcampoalplato.org/documentos/2000Trabajo00.pdf>; Fecha de consulta: 5 de agosto del 2015.
 41. Posada, S.L., Noguera, R.N. (2007). Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20:141-148.
 42. Rearte, D.H., Pieroni, G.A. (2001). Supplementation of temperate pastures. *Proceedings of the International Grassland Congress*. Sao Paulo, Brazil, pp. 679–689.
 43. Rearte, D.H. (1992). Alimentación y composición de la leche en los sistemas pastoriles. CERBAS-INTA. Balcarce. 94 p.
 44. Rearte, D.H., Santini, F.J. (1989). Digestión ruminal y producción en animales en pastoreo. *Revista Argentina de Producción Animal*, 9:93-105.
 45. Reis, R.A., Ruggieri, A.C., Casagrande, D.R., Páscoa, A.G. (2009). Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38:147-159.
 46. Repetto, J.L., Cajarville, C., Curbelo, A., Sapriza, D. (2003). Módulo IV: Suplementos. En: Curso a distancia sobre Nutrición de Rumiantes. Montevideo, Uruguay. p. 1-155.
 47. Repetto, J.L., Aguirre, M., Alonso, M., Curbelo, A., Errandonea, N., Cajarville, C. (2001). Concentración de amoníaco ruminal en vacas a pastoreo, suplementadas con diferentes granos. VII Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. CD ROM.
 48. Robles, V., González, L.A., Ferret, A., Manteca, X., Calsamiglia, S. (2007). Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diets. *Journal of Animal Science*, 85:2538–2547.
 49. Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A., Givens, D.I. (2005). In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 9-30.
 50. Schingoethe, D.J. (1996). Balancing the amino acid needs of the dairy cow. *Animal Feed Science and Technology*, 60:153-160.
 51. Soto-Navarro, S.A., Krehbiel, C.R., Duff, G.C., Galyean, M.L., Brown, M.S., Steiner, R.L. (2000). Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit-fed steers. *Journal of Animal Science*, 78:2215-2222.

52. Stern, M.S., Calsamiglia, S., Endres, M.I. (1994). Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. Universidad de Minnesota, EE.UU. X Curso de especialización de la Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/publicaciones_1994. Fecha de consulta: 20 de diciembre de 2015.
53. Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48:185-197.
54. Valkeners, D., Théwin, A., Piron, F., Beckers, Y. (2006). Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-musled Belgian Blue bulls fed a corn silage-based diet. *Journal of Animal Science*, 84:877-885.
55. Van Soest, P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2ª ed. Ithaca, Cornell University, 476 p.
56. Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991). Symposium: Carbohydrate Methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.
57. Williams, B.A., Bosch, M.W., Boer, H., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S. (2005). An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology*. 123:445-462.
58. Williams, B.A. (2000). Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En: Givens, D.I., Owen, E., Omed, H.M., Axfor, R.F.E. (ed). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford. CAB International. p. 189-213.
59. Yang, C.M.J., Varga, G.A. (1989). Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digesta kinetics, and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72:950-957.
60. Yokohama, M.T., Johnson, K.A. (1988). Microbiología de rumen e intestino En: Church, D.C., *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*, Zaragoza, Acribia. p.137-158.
61. Zabaleta de Lucio, E. (1976). Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. *Ciencias Veterinarias*, 1:223-240.
62. Zebeli, Q., Mansmann, D., Steingass, H., Ametaj, B.N. (2010). Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livestock Science*, 127:1-10.