

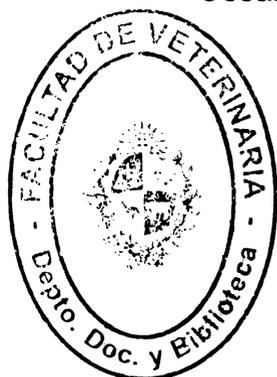


**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**EFFECTO DE DOS FUENTES DE SUPLEMENTACIÓN ENERGÉTICA SOBRE  
LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA EN OVINOS CORRIEDALE  
ALIMENTADOS CON FORRAJES EN DISTINTOS ESTADOS VEGETATIVOS**

Por

**César Fernando ECHAIDES ORTÍZ**



**TESIS DE GRADO** presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Medicina Veterinaria

**MODALIDAD: Ensayo Experimental**



FV-28943

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2009**

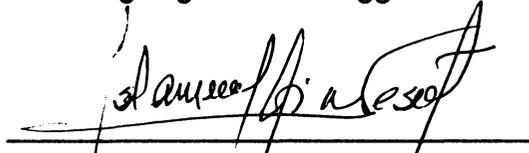
TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:



Ing. Agr. Lucía Piaggio

Segundo Miembro (Tutor):



Dra. Islamey Tebot

Tercer Miembro:



Dr. Martín Aguerre

Fecha:

27/05/2010

Autor:



Br. César Echaides

## AGRADECIMIENTOS.

- A los doctores que aceptarán formar parte del tribunal que evaluará este trabajo.
- A la Dra. Islamey Tebot, por ser mi tutora en esta tesis, por su confianza en mi labor, por su respaldo en mi tarea, pero sobre todo, por su invaluable amistad y guía en mis primeros pasos como clínico e investigador.
- A mi Amiga Br. Ana Secchi, co – tesista. Una persona de tan alto valor humano, capacidad y humildad, que solo ella es la única incapaz de reconocerlo, ya que marca a todo aquel que la conoce de una forma tan única como imborrable.
- A las doctoras Victoria Elizondo, Ana Laura Falero y Alicia Pereyra, también co – tesistas, por su ayuda en el trabajo de campo de este estudio.
- A mis queridos amigos, Br. Ana Laura Pérez, Br. Guillermo Cazzuli, Br. Sebastián Figueroa, Dra. Cecilia Barboza, Dra. Carolina Dabarca, Br. Ximena Gómez, Br. Lorena Bentancor y Br. Marcia Deleón, por estar en las buenas, pero sobre todo, por estar en las malas, gracias a ellos y a su apoyo conseguí encontrar la manera de ser feliz conmigo mismo.
- A mis padres. A mi madre y maestra Mirian Ortiz “La Maestra Chacha”, por ser la original impulsora de mis inquietudes, por enseñarme a “aprender a pensar”. A mi padre Antonio Echaidés “El Bocha”, por enseñarme a través de sus actos los valores humanos que han regido y regirán mi accionar a lo largo de toda mi vida. Pero sobre todo a ambos por su amor incondicional de padres y su capacidad de comprensión.
- A mi tía Odila Ortiz “La Tía”, por su capacidad de postergar muchos de sus objetivos personales en pro del bienestar de quienes la rodeamos, por su apoyo en todo momento y por su ejemplo de vida.
- A mis hermanos, Tomy y José y a mis cuñadas Claudia y Adriana, por apuntarme cuando más lo necesité y por traer al mundo dos maravillosos solitos: Iru y Gui, y por su inagotable y ejemplar capacidad de pelear por lo que se quiere.
- A Fabrizio Di Giovanni, por el aguante en mis horas de “locura”, pero sobre todo por impulsarme en esos momentos en que creí estar estancado.
- A mis “Vecinos - Amigos”, “los Bueno”, una familia que nunca sabré si los adopté a ellos o ellos me adoptaron a mí.
- A mi “Amiga - Vecina” Jessica Alfaro, por su singular forma de darme el necesario aliento cuando no lo encontraba.

- A la Dra. Carmen Leizagoyen y al Dr. Eduardo Tavares por su confianza en mi trabajo, por permitirme aportar mi granito de arena en eso tan basto como esencial que es la medicina para la conservación, pero sobre todo por su quijotesca e invaluable lucha en pro de lograr un "Bioparque" en lugar de un "Zoológico".
- A mis amigas y compañeras de tareas en el parque Lecocq, Nadia Olivera y Nataly Espíndola, por enseñarme otras realidades diferentes que no había tenido la oportunidad de conocer, por su gran compañerismo y extraordinario valor humano.
- A todas mis mascotas, las de hoy y las de siempre, por ese desinteresado cariño.

# TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
1.- <b><u>RESUMEN</u></b> .....	1
2.- <b><u>SUMMARY</u></b> .....	2
3.- <b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	3
4.- <b><u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u></b> .....	4
4.1.- PRINCIPALES NUTRIENTES APORTADOS POR LOS FORRAJES.....	4
4.1.1.- <u>Carbohidratos</u> .....	4
4.1.1.1.- Carbohidratos fibrosos.....	4
4.1.1.2.- Carbohidratos no fibrosos.....	5
4.1.2.- <u>Compuestos nitrogenados</u> .....	6
4.1.3.- <u>Factores que afectan la oferta nutricional del forraje</u> .....	6
4.2.- COMUNIDAD MICROBIANA RUMINAL.....	8
4.2.1.- <u>Composición de la comunidad microbiana ruminal</u> .....	8
4.2.1.1.- Bacterias ruminales.....	10
4.2.1.2.- Protozoarios ruminales.....	10
4.2.2.- <u>Efectos de la dieta sobre la población microbiana</u> .....	11
4.3.- SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL.....	11
4.3.1.- <u>Factores que afectan la síntesis de proteína microbiana</u> .....	13
4.3.1.1.- Aportes de Energía.....	14
4.3.1.2.- Aportes de Nitrógeno.....	14
4.3.1.3.- Sincronización energía – nitrógeno.....	15
4.3.1.4.- Eficiencia de síntesis microbiana.....	15
5.- <b><u>CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA</u></b> .....	15
6.- <b><u>HIPÓTESIS</u></b> .....	16
7.- <b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	16
7.1.- OBJETIVO GENERAL.....	16
7.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
8.- <b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	17

8.1.- LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	17
8.2.- ANIMALES EXPERIMENTALES.....	17
8.3.- EXPERIMENTO, TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
8.4.- CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO.....	17
8.5.- ALIMENTOS Y ALIMENTACIÓN.....	18
8.6.- DESCRIPCIÓN DEL PERÍODO PREELIMINAR.....	19
8.7.- DESCRIPCIÓN DEL PERÍODO DE COLECCIÓN.....	19
8.8.- DETERMINACIONES EN EL ANIMAL.....	19
8.8.1.- <u>Colección de orina</u> .....	19
8.8.2.- <u>Producción de proteína microbiana</u> .....	19
8.8.3.- <u>Eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESM)</u> .....	20
8.8.4.- <u>Funcionalidad renal y eliminación de urea</u> .....	20
8.8.5.- <u>Manejo renal de la urea</u> .....	20
8.9.- ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	22
9.- <b><u>RESULTADOS</u></b> .....	23
10.- <b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	25
11.- <b><u>CONCLUSIÓN</u></b> .....	27
12.- <b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	28

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
<b>Tabla I:</b> Composición química de los alimentos consumidos durante los ensayos experimentales.....	17
<b>Tabla II:</b> Composición química de cada dieta experimental para ambos ensayos experimentales (E1 y E2).....	18
<b>Tabla III:</b> Tabla III: Eliminación urinaria de alantoína (mmol/d), producción estimada de proteína microbiana (PM, g/d) y eficiencia de síntesis microbiana (ESM, g N/Kg de MODI, MODR) para los tres grupos en ambos ensayos (E1 y E2).....	20
<b>Tabla IV:</b> Uremia y manejo renal de la urea, comparada entre los Tratamientos en ambos ensayos (E1 y E2).....	21
<b>Tabla V:</b> Uremia y manejo renal de la urea comparada entre ambos ensayos experimentales, E1 (vegetativo temprano) y E2 (vegetativo tardío)..	21
<b>Figura 1:</b> Esquema del desarrollo de los protocolos experimentales.....	17

## 1.- **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el consumo de pasturas templadas en distintos estados vegetativos necesitan suplementación energética para mejorar la producción de proteína microbiana ruminal en ovinos. Dieciocho ovejas no gestadas ni lactantes provistas de catéteres yugulares y sondas vesicales alojadas en jaulas metabólicas se dividieron en 3 grupos (n = 6): F (forraje), FG (forraje 70% + grano 30%), FGM (forraje 70% + grano 15% + melaza 15%), durante 2 ensayos: E1 (forraje en estado vegetativo temprano) y E2 (forraje en estado vegetativo tardío). De las 4 comidas diarias (9, 13, 18 y 23 hs), se suplementaron la 1<sup>a</sup> y la 3<sup>a</sup>. Se determinó eliminación urinaria de alantoína, producción de proteína microbiana y eficiencia de síntesis microbiana, uremia y manejo renal de la urea. La suplementación energética no aportó mejoras importantes en la producción de proteína microbiana ni en la eficiencia de síntesis. No se encontraron reducciones en la uremia inherentes a la suplementación. En conclusión, la suplementación energética no mejoró la producción de proteína microbiana ni la eficiencia de síntesis.

**Palabras clave: proteína microbiana, suplementación energética, ovinos.**

## 2.- SUMMARY

The aim of this work was to evaluate if the consumption of the temperate fresh forage, in two vegetative states need of energy supplementation to improve the microbial protein production in sheep. Eighteen ewes fitted with jugular and bladder catheters housed in metabolic cages were randomly divided into 3 groups (n = 6) with different diets: F (forage), FG (forage 70% + grain 30%) and FGM (forage 70 % + grain 15% + molasse 15%), during 2 essays: E1 (forage in early vegetative state) and E2 (forage in late vegetative state). They received 4 daily-meals (9, 13, 18 and 23 h) the first and the third were supplemented. Urinary allantoin elimination, microbial protein production and efficiency of microbial protein synthesis, blood urea concentration and renal handling of urea were measured. Energy supplementation did enhance neither microbial protein production nor the efficiency of microbial protein synthesis. There were not reductions on blood urea concentration related to supplementation. In conclusion, energy supplementation did not improve the microbial protein production and the efficiency of microbial protein synthesis.

**Key words: microbial protein, energy supplementation, sheep.**

### 3.- INTRODUCCIÓN

[14]

Nuestro país se encuentra entre las regiones del mundo con mayor potencial para la producción ganadera gracias a factores tales como su clima templado, 1300 mm<sup>3</sup> de precipitación anual y suelos fértiles. El área de pasturas mejoradas representa un 17% de la superficie y la base forrajera disponible soporta aproximadamente 12 000 000 vacunos y 10 800 000 ovinos (DIEA, 2006). Si bien las pasturas (tanto naturales como artificiales) siguen siendo el escenario planteado para la producción animal tanto extensiva como intensiva, la variabilidad en su oferta nutricional a lo largo del año debido a los distintos efectos climáticos, hacen que su disponibilidad no sea constante a lo largo del ciclo productivo. Esto obliga a planificar diferentes estrategias a fin de mantener un nivel adecuado de aporte nutricional y aprovechamiento del mismo. En la producción ovina la suplementación puede ser realizada con diferentes objetivos. La suplementación estratégica ha sido asociada fundamentalmente a momentos críticos en algunas categorías como majada de cría en fin de gestación y primera etapa de lactancia, cuando por condiciones climáticas la cantidad y/o calidad del pasto son insuficientes, y con menos frecuencia para recría invernal o estival. Lograr un forraje de buena calidad es una onerosa inversión que tiene que ser redituable para el productor. Es conocido que en ciertos estados de maduración la pastura ofrece mas nitrógeno de lo que el animal puede aprovechar, reflejándose en una potencial pérdida productiva. Una forma planteada para maximizar el aprovechamiento del nitrógeno es suministrar energía extra a la biomasa ruminal por medio de concentrados energéticos (CE). Este aporte de energía puede ser en forma de cereales (granos) y/o azúcares. La importancia de los microorganismos que constituyen la biomasa ruminal, en la fisiología digestiva y por ende en la productividad de los rumiantes es evidente. En base a esto es que se programan las distintas metodologías de alimentación a fin de optimizar la interacción entre estos microorganismos y su hospedero, una de ellas es la sincronización entre el aporte proteico (nitrógeno) y el concentrado energético (CE). Sin embargo pocos son los trabajos que estudian el efecto de esta suplementación sobre la producción de proteína microbiana y el metabolismo renal del nitrógeno, con el fin de mejorar las mencionadas estrategias nutricionales. Este trabajo procura evidenciar los efectos sobre la síntesis de proteína microbiana (estimada mediante la dosificación urinaria de alantoína) y el metabolismo renal del nitrógeno, al alimentar ovinos con niveles de mantenimiento a base de forraje con diferentes estados de maduración (temprano y tardío) y CE de diferente naturaleza (granos de cebada aplastados y melaza) en forma sincronizada.

## **4.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

### **4.1.- PRINCIPALES NUTRIENTES APORTADOS POR LOS FORRAJES.**

El consumo de forraje por pastoreo directo o eventualmente conservado, es la base nutricional de los rodeos y majadas del Uruguay (INIA 2007), lo que resulta en una ingestión de altos niveles de fibras vegetales. La base conceptual que explica las diferencias en el valor nutritivo de las pasturas radica en la anatomía, fisiología y bioquímica de la planta (células, tejidos) y en su composición morfológica, distribución y proporción de órganos (Hacker, 1981). Los principales nutrientes aportados por el forraje son carbohidratos, proteína, lípidos y minerales.

#### **4.1.1.- Carbohidratos**

Los carbohidratos (CH) representan el 45 – 80 % de la materia seca y constituyen la principal fuente de energía para los micro-organismos (mo) ruminales (Hungate, 1966; Sniffen y Robinson, 1987) y el componente cuantitativamente más importante de la dieta de los rumiantes. La NRC (2001) los clasifica según su ubicación en CH estructurales y CH no estructurales, en donde las pectinas junto a la celulosa, hemicelulosa y lignina forman el grupo de los CH estructurales; y el almidón, los azúcares solubles y los ácidos orgánicos constituyen el grupo de los CH no estructurales. Para esta revisión se tomará la clasificación propuesta por Van Soest (1994), quien divide los CH en fibrosos (celulosa, hemicelulosa y lignina) y no fibrosos (almidón, azúcares solubles, pectinas y ácidos orgánicos).

#### **4.1.1.2.- Carbohidratos Fibrosos**

Los carbohidratos fibrosos (CHF) son los componentes de la pared de las células vegetales, poseen una concentración energética baja y pueden limitar el nivel de ingesta por parte del rumiante. Además, las enzimas digestivas propias del rumiante son incapaces de degradarlos por lo que la simbiosis con los mo existentes en el rumen toma capital importancia (Chesson y Forsberg, 1988; Ørskov y Ryle, 1998). Van Soest (1994) estudió los constituyentes de las paredes vegetales y los clasificó en fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD), según su reacción frente a una solución detergente neutra y una solución detergente ácida respectivamente. A partir de ahí se utilizan estos valores como estimadores de la calidad de los forrajes, ingestión de materia seca (MS), digestibilidad y valor energético de los alimentos (Calsamiglia 1997).

Fibra neutro detergente se denomina al material insoluble en una solución detergente neutra; y se compone de hemicelulosa, celulosa y lignina, pudiendo contener residuos de almidón, cenizas y nitrógeno (N) (Van Soest, 1994). El procedimiento para determinar la FND separa los componentes del forraje solubles y totalmente digestibles, de los que no lo son y que dependen de la fermentación microbiana en el rumen para que se conviertan en parcialmente disponibles para el animal.

El contenido de FND se toma frecuentemente como indicador del potencial de consumo entre varias o en una especie forrajera (Fahey y Berger, 1988).

Fibra ácido detergente se denomina al material insoluble en una solución detergente ácida, estando compuesta por celulosa y lignina, aunque puede contener residuos de N y minerales (Van Soest, 1994). La lignina es un compuesto fenólico de alto peso molecular que se encuentra íntimamente relacionada con los CHF, lo que determina su inclusión como parte de la fibra vegetal (Cheng et al., 1991). Adiciona rigidez a la estructura de las plantas y limita el ataque por parte de los mo a los CHF, disminuyendo así, la digestibilidad de los mismos. Los contenidos de los alimentos en FAD y lignina se consideran como indicadores de la digestibilidad relativa de los forrajes (Fahey y Berger, 1988). Sin embargo, el grado de degradación de la fibra no solamente dependerá de la proporción de los componentes que la forman, sino que es mas complejo y se verá afectado por diversos factores propios del animal (como la masticación y la salivación), del ambiente ruminal existente en el momento de la ingestión de esa fibra, entre otros.

Se encontró una alta correlación negativa entre el consumo de materia seca (MS) y el contenido de FND o pared celular de los forrajes (Mertens, 1973; Osbourn et al., 1974). Cuando los animales se alimentan de forrajes con un alto contenido de fibra el consumo decrece. El aumento en los contenidos fibrosos de la dieta hace que se recargue la capacidad del rumen y se incremente el tiempo de permanencia de esta fibra en el tracto digestivo (Mertens, 1994; Jung y Allen, 1995). Sin embargo, el consumo de fracciones fibrosas aporta una textura física al contenido ruminal que permite el mantenimiento de un medio ruminal adecuado (Bach y Calsamiglia, 2006), así como también condiciones de pH que favorezcan la digestibilidad (Nocek y Grant, 1987). Estas características funcionales dependen del tipo, forma y tamaño de la fibra, así como del grado de lignificación, hidratación y volumen (Varga y Kolver, 1997), surgiendo así el concepto de fibra efectiva como índice de valoración de la capacidad real de la fibra como estimulante de la rumia y la salivación (Calsamiglia et al., 2002; Bach y Calsamiglia, 2006). Por lo tanto, la formulación de raciones adecuada debe orientarse a buscar el equilibrio entre ingestión máxima de MS y el mantenimiento de funciones y condiciones normales del rumen incluyendo ciertos niveles mínimos de FND y de FAD (Calsamiglia, 1997).

#### 4.1.1.3.- Carbohidratos no fibrosos

Los carbohidratos no fibrosos (CHNF) aportan altas cantidades de energía (E) y comprenden los CH de reserva de los vegetales, azúcares solubles (AS), pectinas y ácidos orgánicos (Napoli y Santini, 1987). Conforman la base de la suplementación de dietas basadas en forrajes frescos e incluyen a los granos de cereales (maíz, trigo, avena, cebada, sorgo); y los azúcares y extractos azucarados (glucosa, sacarosa, melaza). Los granos de cereales proveen materia orgánica (MO) extra fermentable para la biomasa microbiana ruminal (Obara et al., 1991) y contienen entre un 70 y un 80% de almidón (French, 1984), siendo éste el CH de reserva más importante para los vegetales (Christen, 1977; Buxadé, 1995; García et al., 2006). Por su alto valor energético y elevada palatabilidad, los granos son materia prima de elección para cubrir las necesidades energéticas de los rumiantes en producción (de Blas et al., 1995). La digestión del almidón en los distintos granos es prácticamente completa, pero existen diferencias en cuanto a la proporción del almidón fermentado en el rumen y el digerido en tramos posteriores del aparato digestivo. El trigo y la cebada se caracterizan por una fermentación mas rápida y completa en el rumen, que los granos de maíz y sorgo (de Blas et al., 1995). Herrera-Saldana et al. (1990)

observaron *in vivo* e *in vitro* que la degradabilidad ruminal del almidón de diferentes cereales era, de mayor a menor: avena > trigo > cebada > maíz > sorgo.

Los carbohidratos solubles (CHS) en las pasturas se encuentran dentro de estructuras que los preservan de su degradación (cutículas, ceras, cubiertas de semillas, etc.) defendiéndolos de los ataques de microorganismos e insectos fitófagos (Forsberg y Cheng, 1992), y obstaculizando su degradación a nivel ruminal. Determinados tratamientos físicos y químicos pueden mejorar la degradación ruminal del almidón, mediante la alteración de las mencionadas estructuras (Cheng et al., 1991; Beauchemin et al., 1993). Una vez que los CHS son accesibles al ataque de los mo son rápidamente utilizados y constituyen un aporte energético fundamental para un adecuado funcionamiento ruminal. El contenido celular posee una digestibilidad casi total (McDonald et al., 2002), con variaciones en su degradabilidad ruminal según la especie forrajera de que se trate, y en líneas generales, según se trate de gramíneas o leguminosas (Van Soest, 1994).

#### 4.1.2.- Proteína y nitrógeno no proteico

Los forrajes aportan varios tipos de proteínas además de nitrógeno no proteico (NNP), que en conjunto son incluidos en el término proteína cruda o proteína bruta (PB). Gracias a los procesos de degradación y síntesis de proteína a nivel ruminal, los rumiantes, a diferencia de los monogástricos, logran satisfacer sus necesidades proteicas a partir del aporte de sustancias nitrogenadas simples y proteínas de baja calidad las cuales se transforman en proteínas de alto valor biológico y de composición relativamente constante.

La proteína aportada por los forrajes frescos es altamente degradable en rumen con un promedio del 75-85% para las distintas especies forrajeras (Elizalde et al., 1999). El contenido proteico de las pasturas templadas esta relacionado directamente con la calidad de la pastura. En nuestro país el contenido de PB de las pasturas no suele ser limitante para el crecimiento microbiano, debido a los altos niveles y elevada degradabilidad proteica de las mismas (Repetto et al., 2005). En nuestro país y durante los meses de invierno se han detectado en *Avena sativa* y *Trifolium repens* frescos valores de PB en el entorno de 18 y 13% respectivamente (INIA 2004). En nuestra región estudiando praderas templadas se han encontrado valores de PB que van de 14,4 a 19% (Rearte y Santini, 1989; Cajarville et al., 2000; Repetto et al., 2000; Pérez et al., 2006).

#### 4.1.3.- Factores que afectan la oferta nutricional del forraje.

Las pasturas y otros tipos de forrajes, muestran gran variación en su valor nutritivo en sus distintas etapas de crecimiento y en las diferentes fracciones de la planta (Pigurina y Methol, 2004). Estas diferencias están influenciadas además por las variaciones en las condiciones ambientales (suelo, clima, fertilizaciones), por el manejo y por el material genético de las plantas (que no será desarrollado en esta revisión).

##### 4.1.3.1.- Factores relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas.

El crecimiento de los vegetales es el resultado del balance entre dos procesos opuestos: a) fotosíntesis, que fija el anhídrido carbónico en compuestos orgánicos, dependiendo de la superficie foliar y de las condiciones ambientales y b) respiración,

que mediante la oxidación de los carbohidratos suministra energía para las demás funciones vitales y que depende también de las condiciones ambientales y del nivel de reserva de la planta (Millot et al., 1987). Según el tipo de metabolismo fotosintético, en nuestro país se encontraron mayores porcentajes de materia seca y azúcares solubles en plantas C4 respecto a plantas C3 (Antúnez et al., 2007). En términos de su comportamiento fisiológico, en las pasturas pueden reconocerse dos estados: a) el estado vegetativo, que comprende la generación de hojas y macollos o tallos, previo a la iniciación de la inflorescencia, y b) el estado reproductivo, que abarca el período comprendido entre la iniciación de la inflorescencia y su evolución posterior, hasta el desarrollo de las semillas (Cangiano, 1997). En el proceso de crecimiento existe un progresivo avance de la madurez donde los forrajes incrementan su contenido de lignina, lo cual ocasiona un mayor descenso de la degradabilidad de los elementos contenidos en la pared celular, lo que reduce la disponibilidad energética y proteica para el animal (Van Soest y Wine, 1967; Parra et al., 1972; Minson, 1981; Cheng et al., 1991). Por lo tanto a medida que las pasturas maduran, disminuye progresivamente su valor nutritivo para el rumiante.

#### 4.1.3.2.- Factores ambientales.

Para lograr la supervivencia las plantas desarrollan dos estrategias que consisten en almacenar sustancias de reserva y en generar defensas contra agresiones externas. Bajo condiciones adversas, el almacenaje de sustancias de reserva es esencial para la supervivencia de la planta. Estas reservas serán empleadas además, para el rebrote siguiente a etapas adversas, tales como la defoliación (pastoreo o corte) o períodos climáticos desfavorables. Las sustancias de reserva son altamente digestibles (Van Soest, 1994).

La temperatura es el factor que ejerce mayor influencia en la calidad del forraje. Al aumentar la misma, la digestibilidad disminuye como resultado de la combinación de dos efectos: alta temperatura ambiente resulta en aumento de la lignificación de la pared celular, y además promueve un incremento de la actividad metabólica con elevación de la tasa de crecimiento, lo cual disminuye el pool de metabolitos en el contenido celular. A mayor temperatura aumenta la actividad enzimática asociada a la biosíntesis de lignina (Van Soest., 1994), disminuyendo progresivamente la digestibilidad de la pastura.

El efecto de la luz es ejercido directamente en el metabolismo de la planta a través de la fotosíntesis. Cantidades de luz adicional promueven la acumulación de azúcares y el metabolismo general del nitrógeno, generando nutrientes fundamentales para el rumiante. Estudios realizados en nuestro país sobre pasturas templadas señalan un incremento de carbohidratos solubles en horas de la tarde en relación a la mañana (Pérez et al., 2006; Antúnez et al., 2007), coincidiendo con el momento de mayor actividad fotosintética (Owens et al., 1999). La defoliación (pérdida física de hojas y tallos) le significa un estrés importante a la planta la cual debe movilizar las reservas para formar nuevas hojas y recomponer la capacidad fotosintética (Parson y Penning, 1988; Van Soest, 1994). Este proceso frena la lignificación, logrando siempre un efecto positivo en la digestibilidad del forraje.

#### 4.1.3.3.- Factores de manejo

En un sentido amplio, un adecuado manejo de las pasturas debe considerar la interacción pastura-animal-ambiente con el objetivo de alcanzar máximos rendimientos de forraje en cantidad y calidad, con la mejor estabilidad y persistencia de la pastura junto al óptimo de producción animal (Carámbula, 1997).

Considerando la interfase planta-animal, podemos considerar los siguientes aspectos en el manejo de las pasturas.

- Factores del animal y consumo. Existen diferencias entre razas vacunas y ovinas en la cantidad y selectividad del forraje ingerido.
- Carga animal. La dotación o número de animales por hectárea es uno de los factores más importantes en determinar el rendimiento de las pasturas y la productividad animal. Las altas cargas animales pueden llevar a la desaparición de las mejores especies forrajeras y a la aparición de alto número de malezas en pasturas naturales (Carámbula 1996).
- Manejo del pastoreo. A través de distintos tipos de manejo (continuo, controlado, rotativo, en franjas), se ejerce un control sobre el área de pastura que condiciona la calidad y el aprovechamiento de la misma.

Otro factor de manejo que afecta las características de la pastura es la quema (pasturas naturales), que estimula el rebrote y provee al ganado forraje tierno, cambiando la relación entre biomasa verde y seca, mejorando la accesibilidad y calidad (Sacido et al., 1995b). El fuego prescrito aplicado a un pajonal produce una mejora en la calidad de la oferta que cubre siempre los requerimientos nutricionales de los animales más exigentes, debido a los aportes de los rebrotes de las distintas especies (Sacido et al., 2004). Este tipo de manejo está indicado en pasturas con alto porcentaje de pajonal, con baja palatabilidad y digestibilidad.

#### 4.2.- LA COMUNIDAD MICROBIANA RUMINAL

##### 4.2.1.- Componentes de la comunidad microbiana

Dentro del rumen habita una amplia flora microbiana en relación de simbiosis con el hospedero. El rumiante les provee a estos un nicho ambientalmente favorable, con un nivel de agua libre del 85 al 90%, una temperatura de 39 a 41°C, un nivel de pH regulado y mantenido en valores entre 5.5 y 7.2, y con un suministro continuo de alimentos y remoción de productos finales. Los microorganismos, por su parte, le ofrecen al rumiante un servicio digestivo, que proporciona grandes cantidades de energía disponible que el animal hospedero no puede obtener a través de procesos digestivos propios (Calsamiglia et al., 2005).

Si bien el número relativo de las diferentes especies de microorganismos dependerá de la composición y estructura de la dieta, así como de las diferentes interacciones entre ellas, se puede precisar que la mayoría de los microorganismos presentes en el rumen son anaeróbicos estrictos y los dos tipos principales son bacterias y protozoarios (Ørskov, 1992). A su vez, aproximadamente la mitad de la biomasa ruminal son bacterias, entre un 20 y un 40 % son protozoarios y aproximadamente un 8 % son hongos (Castillo y Roldán, 2005).

#### 4.2.1.1.- Las bacterias ruminales

Son responsables de gran parte de las funciones digestivas vitales para el hospedero y constituyen la mayor y más diversa población microbiana que está presente en el rumen (Phillips y Gordon, 1995). La población bacteriana del rumen está comprendida entre  $8 \times 10^9$  y  $4 \times 10^{10}$  células por ml de contenido. Conforman alrededor del 50% de la biomasa microbiana y representan la categoría de más compleja y más importante. Esta fracción de la comunidad microbiana ruminal está compuesta esencialmente por bacterias anaerobias estrictas no esporuladas. Estas fueron descritas y clasificadas por Hungate (1966), sobre la base de la utilización de sustratos y productos finales producidos. Los principales grupos así definidos son: celulolíticos, hemicelulolíticos y pectinolíticos, amilolíticos, ureolíticos, metanogénicos, proteolíticos, productores de  $\text{NH}_3$ . Otra forma de clasificarlos es según el nicho ecológico ruminal donde se desarrollan. En base a esto Cheng y Costerton (1980) las clasifican en: Solid Adherent Bacteria, SAB (adheridas a las partículas alimenticias), Liquid Associated Bacteria, LAB (libres en el líquido ruminal), Flora epimural (fijadas a la pared interna del rumen). Según Minato et al. (1966), alrededor de la mitad de la población bacteriana estaría adherida a las partículas vegetales.

*Las SAB;* representan alrededor del 50% de la población bacteriana y están adheridas a las partículas vegetales. (Minato et al., 1966), además el 75% del ATP microbiano detectado en el rumen estaría fijado a las partículas (Fosberg y Lam, 1977). La adhesión bacteriana se hace sobre las paredes vegetales y sobre los tejidos celulósicos implicando principalmente a las bacterias que degradan los polímeros parietales (celulolíticas). Las bacterias amilolíticas se adhieren igualmente a los granos de almidón. *Las LAB;* son bacterias de crecimiento rápido ya que utilizan sustratos solubles (Cheng y Costerton, 1980). *La Flora epimural;* está compuesta por bacterias anaeróbicas facultativas, caracterizadas por su fuerte actividad proteolítica y ureolítica. Esta población bacteriana parece ser más independiente a la naturaleza de la alimentación que la población libre. El rol jugado por estas bacterias es muy importante y sus funciones principales son las de hidrolizar la urea que difunde a través de la pared del rumen o que proviene de la saliva hasta  $\text{NH}_3$ ; degradar las células epiteliales fuertemente queratinizadas provenientes de la descamación de la mucosa ruminal, lo que permite aprovechar las proteínas casi insolubles como la queratina y al ser anaerobias facultativas son capaces de metabolizar el oxígeno que difunde a través de la pared del rumen desde la sangre, impidiendo que alcance la luz del órgano. Manteniendo así la anaerobiosis del ambiente ruminal.

#### 4.2.1.2.- Los protozoarios del rumen

Estos no habitan el rumen en asociación con las bacterias, compartiendo la función de fermentar los nutrientes presentes en el medio. Uno de los principales sustratos utilizados por los protozoarios son las mismas bacterias, las que aparentemente les sirven como fuente de proteína, energía y ácidos nucleicos (Mora, 1991). Son esencialmente ciliados (muy escasos flagelados). Su número no excede generalmente  $2$  a  $5 \times 10^6$  organismos por ml de contenido ruminal (Hungate, 1966) pero por su tamaño mayor al de las bacterias, logran constituir cerca del 50% de la biomasa microbiana del rumen. Están generalmente libres en el líquido ruminal, pero algunos se fijan a las partículas vegetales. Los ciliados son capaces de transformar

un gran número de constituyentes alimentarios y bacterianos en metabolitos y en compuestos celulares que serán rápidamente utilizados por el rumiante.

#### 4.2.2.- Efecto de la dieta sobre las poblaciones microbianas

La población microbiana esta directamente determinada por el tipo de sustrato mayoritario que compone la dieta del rumiante. Dietas con una base forrajera determinan una flora predominantemente celulolítica, mientras que dietas ricas en CHNF y con bajos niveles de fibra favorecerán la instalación de una flora amilolítica (Mc Allister et al., 1993). Las dietas ricas en CHNF son altamente digestibles con formación muy rápida de grandes cantidades de ácidos grasos volátiles (AGV). Esta producción, que en algunas ocasiones puede ser excesiva, tiene como consecuencia una disminución del pH ruminal con reducción de las poblaciones celulolíticas y metanogénicas (Van Soest, 1982).

Las poblaciones microbianas necesitan, para su mantenimiento y crecimiento, tanto energía (provista por los CH) así como nitrógeno (N). Estos dos sustratos principales serán suministrados por la dieta y de esta forma, dependiendo sobre todo del tipo de CH y del nivel suministrado, se determinará el perfil del ecosistema ruminal.

#### 4.3.- SÍNTESIS DE PROTEÍNA MICROBIANA RUMINAL

La síntesis de proteína microbiana ruminal puede definirse como la cantidad de proteína de origen microbiano producida en el rumen (síntesis neta), expresándose en gramos de N o de proteína ( $N \times 6.25$ ) por día (Van Soest, 1994; Broudicou y Jouany, 1995). Suele estimarse como la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen que fluye al duodeno (flujo de proteína microbiana). Sin embargo, la síntesis diaria de proteína microbiana no es equivalente al flujo diario, ya que existe una parte importante de la proteína microbiana sintetizada en rumen que no llega al intestino delgado, sino que se recicla dentro del rumen en proporciones variables, como consecuencia de la actividad predatoria de los protozoarios, y en menor grado, por la acción de los bacteriófagos y micoplasmas (Firkins, 1996). Este reciclaje de N afecta a la cantidad y a la eficiencia neta de la conversión de los sustratos en proteína microbiana, dado que la proteína microbiana degradada está sujeta a la desaminación, requiriéndose energía para su resíntesis (Dijkstra et al., 1998).

##### 4.3.1.- Factores que afectan la síntesis de proteína microbiana y su eficiencia

El rumen esta poblado por distintos mo con diferentes requerimientos nutritivos y niveles metabólicos, constituyendo un ambiente tan rico como complejo para su estudio. Por lo tanto considerar los requerimientos nutritivos de los mo ruminales es crucial para entender el metabolismo del N en el rumen así como los factores que puedan modificarlo. Los principales factores limitantes para la síntesis de proteína microbiana son el aporte de energía y el aporte de N (Hoover y Stokes, 1991; Clark et al., 1992). El crecimiento de las células microbianas depende principalmente de la degradación de la materia orgánica aportada al rumen, que proporciona la energía y los monómeros necesarios para la síntesis de los constituyentes celulares (proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos). La energía se obtiene fundamentalmente de la degradación de los CHO y el N puede provenir del nitrógeno no proteico (NNP), de la proteína verdadera y/o del aporte endógeno. Otros nutrientes, como el azufre, los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada

(AGV-R) y los minerales y vitaminas, también son esenciales, aunque en una proporción menor. Numerosos factores relacionados a la dieta pueden alterar la disponibilidad de energía y de N para el crecimiento bacteriano.

#### 4.3.1.1.- Aportes de Energía

Los CHO (estructurales y no estructurales) son la principal fuente de energía para la síntesis de proteína microbiana en el rumen, representando entre un 65-75% de la MS de la dieta de un rumiante (Sniffen y Robinson, 1987). La proteína aporta la mitad de la energía que los CHO (Demeyer y Van Nevel, 1986; Tamminga et al., 1979). Sin embargo, el crecimiento bacteriano se acelera cuando se adicionan aminoácidos y/o péptidos a cultivos de bacterias amilolíticas y celulolíticas (Kernick, 1991; Maeng y Baldwin, 1976;). Igualmente, la digestión de la fibra se incrementa con el suministro de aminoácidos (Carro y Miller, 1999) y péptidos (Cruz Soto et al., 1994) a cultivos puros de bacterias celulolíticas. El aumento en el crecimiento bacteriano observado por la adición de aminoácidos y/o péptido, podría deberse a la incorporación directa de éstos a la proteína microbiana o al aumentar la disponibilidad de los esqueletos carbonados (provenientes de la desaminación de los aminoácidos), los cuales serían utilizados como fuente de energía de producción o como esqueletos carbonados para la formación de nuevos aminoácidos microbianos (Bryant, 1973). Atasoglu et al. (2004) estudiaron el destino del N y los carbonos de los aminoácidos en cultivos mixtos de microorganismos ruminales. Los resultados muestran que algunos aminoácidos fueron sintetizados con más dificultad que otros, lo que sugiere que ciertos aminoácidos pueden ser limitantes para el crecimiento bacteriano. Estos autores confirman la teoría de la dificultad de las bacterias para sintetizar algunos aminoácidos (fenilalanina, leucina) propuesta por Amin y Onodera (1997) y proponen a la leucina como un aminoácido potencialmente limitador del crecimiento. Por lo tanto, el asegurar un suministro importante de aminoácidos específicos podría resultar en un mayor crecimiento microbiano. La disponibilidad de energía está reconocida como el principal determinante del crecimiento microbiano por los distintos modelos que se utilizan para predecir la síntesis de proteína microbiana (Dijkstra et al., 1998). Los mo que degradan los CHO estructurales (celulolíticos) tienen bajos requerimientos de mantenimiento, crecen lentamente y utilizan el N-NH<sub>3</sub> como su principal fuente de N, mientras que los microorganismos que degradan los CHO no estructurales (amilolíticos) tienen altos requerimientos de mantenimiento, crecen rápido y utilizan el NH<sub>3</sub>, los péptidos y los aminoácidos como fuentes de N (Russell et al., 1996).

#### 4.3.1.2.- Aportes de nitrógeno

El N es el otro factor relacionado con la dieta que más limita el crecimiento y la síntesis de proteína microbiana en el rumen (Stern y Hoover, 1979; NRC, 2001). Los aportes nitrogenados se deben clasificar, en primer lugar, en exógenos, procedentes del alimento, y endógenos, aportados por el propio rumiante. A partir de aquí, ambos se pueden diferenciar en proteicos y no proteicos. Los alimentos contienen varios tipos de proteína y nitrógeno no proteico (NNP), que en conjunto constituyen la fracción analítica denominada *Proteína Bruta (PB)* o *Proteína Cruda (PC)*. A diferencia de especies monogástricas, las necesidades proteicas pueden ser totalmente solventadas a partir del aporte de sustancias nitrogenadas simples y proteínas de baja calidad, convirtiéndolas en proteínas de composición relativamente constante con alto valor biológico. Este enriquecimiento en el aporte proteico al

rumiante se da gracias a la síntesis de proteína microbiana. Cuando el aporte de N (tipo y cantidad) es inadecuado, disminuye el crecimiento bacteriano y se reduce la actividad fermentativa (Stern et al., 1994), sin embargo la eficiencia de síntesis se mantiene (Tebot et al., 2002). La cantidad de proteína degradable en rumen necesaria para obtener un máximo crecimiento de mo ruminales oscila entre 10-15% (en base seca) (Hoover y Stokes, 1991; Stern et al., 1994). Asimismo Hoover y Stokes (1991) sugieren que para no afectar la síntesis de PM el nivel de proteína degradable en rumen de la dieta debiera ser superior al 10-11 % (en base seca). Por otro lado, Owens y Zinn (1993) señalan que si el nivel de PB de la dieta es inferior a 13-15%, la PB que abandona el rumen supera generalmente a la aportada por la dieta, lo que ocurriría por un reciclaje mayor de urea hacia el rumen. En líneas generales varios autores indican que la síntesis de proteína microbiana (g/d) y la ESM se incrementan en respuesta al aumento del contenido de proteína degradable en la dieta (Clark et al, 1992; Erasmus et al., 1994).

#### 4.3.1.3.- Sincronización en los aportes de energía y proteína

La presencia de los sustratos necesarios para la síntesis de proteína microbiana ruminal son tan importantes como la simultaneidad en la que estos sean suministrados. Cuando la tasa de degradación proteica excede la tasa de CHO fermentados, grandes cantidades de N pueden ser perdidas como  $\text{NH}_3$ , e inversamente, cuando la tasa de fermentación de los CHO excede la tasa de degradación proteica, la síntesis proteica microbiana puede disminuir (Nocek y Russell, 1988). Los efectos de la sincronización CHO/N, estudiados por muchos autores, no son concluyentes y a veces contradictorios. Mientras que algunos estudios *in vivo* muestran una respuesta positiva en la producción de proteína microbiana (Herrera-Saldana et al., 1990; Matras et al., 1991), estudios *in vitro* no encuentran ninguna mejora en la producción (Henning et al., 1991; Newbold y Rust, 1992). A pesar de que el concepto de sincronización proteína y energía tiene una base teórica sólida es probable que, en el complejo ecosistema microbiano ruminal, cuando el aporte de nutrientes es sincronizado para una sub población específica no lo sea para otra.

#### 4.3.1.4.- Eficiencia de síntesis microbiana

Maximizar el crecimiento bacteriano y la cantidad de proteína degradable en rumen son dos objetivos a tener en cuenta al momento de establecer las estrategias de nutrición en rumiantes. Al maximizar la captura del N degradable mejoramos el suministro de aminoácidos al intestino y disminuimos las pérdidas de N. La eficiencia de crecimiento microbiano se establece como los gramos de N microbiano/unidad de energía disponible en rumen, generalmente expresado como MO o CHO fermentados. Esta forma de expresar la eficiencia es utilizable cuando se supone que la energía es el factor limitante para el crecimiento bacteriano. Al maximizar la cantidad de proteína microbiana por unidad de materia fermentescible debería resultar en un máximo de crecimiento bacteriano.

## 5.- CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Las pasturas son el recurso más abundante y más económico utilizado por los sistemas productivos regionales, y como alimento base es capaz de mantener buenos niveles de productividad cuando es consumido *ad libitum* (Pulido et al,

2001). En condiciones de pastoreo es de particular importancia considerar la calidad del forraje en relación a su estado vegetativo (temprano o tardío) (Beever y Siddons, 1986), el aporte constante de energía a los microorganismos (Ulyatt et al., 1975) y un posible desbalance entre la disponibilidad ruminal de los sustratos nitrogenados y los energéticos (Van Vuuren et al., 1990). En ciertas épocas del año (otoño e invierno) los forrajes en estados vegetativos tempranos, se caracterizan por presentar un bajo contenido de materia seca además de relaciones bajas de CHO solubles/N, lo que puede llevar a grandes pérdidas de N por una reducida síntesis proteica microbiana (Beever, 1993; Elizalde et al., 1996, Trevaskis et al, 2001). Esto supone una escasa utilización de amoníaco resultante de las fermentaciones. En estos casos, la limitante para la producción de proteína microbiana no es el N sino la energía. Por lo tanto, para mejorar el aprovechamiento del nitrógeno, es necesaria una suplementación energética que permita una mayor retención de N-NH<sub>3</sub> en el animal. La sustitución parcial y puntual de forrajes de alta calidad por moderadas cantidades de SRE (30 a 35% de MSI) ha sido sugerida para mejorar la sincronización entre energía y proteína en el rumen por un lado (Hungtington, 1997) y la fermentación ruminal por otro. De esa manera se logran minimizar la pérdidas de N sin afectar la digestión de la fibra (Repetto et al., 2000; Bargo et al., 2003). Sin embargo, las repercusiones de la suplementación energética sobre el ambiente ruminal (variaciones de pH y N-NH<sub>3</sub>, alteración de la digestibilidad de la fibra y MO) y su posterior impacto sobre la síntesis proteica microbiana deben ser tenidos en cuenta para no alterar la productividad del rumiante. Las consecuencias positivas o negativas de la suplementación energética dependerán, en cierto grado, de la calidad del forraje base suministrado (estado vegetativo tardío o temprano). Si bien, en términos generales, se puede afirmar que la suplementación con alimentos energéticos mejora el aprovechamiento de nitrógeno excedente ofrecido por el verdeo o pastura, la pertinencia de esta suplementación dependerá de la calidad del forraje que se ofrezca como dieta base.

## **6.- HIPÓTESIS**

Por lo tanto, la hipótesis del presente estudio se basa en el supuesto de que al suplementar forrajes templados en temprano estado de maduración con carbohidratos solubles se esperaría un mayor aprovechamiento del N que aportan, reflejándose en una mayor producción de proteína microbiana.

De verificarse esta hipótesis, la utilización de suplementación energética de forrajes en estado vegetativo temprano en animales a pastoreo, sería una herramienta nutricional útil para optimizar la producción de proteína microbiana a nivel ruminal y por consiguiente, mejorar la eficiencia en la producción animal.

## **7.- OBJETIVOS**

### **7.1.- OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de la suplementación con fuentes energéticas de distinta velocidad de degradación sobre la producción de proteína microbiana y el ahorro y eliminación del nitrógeno a nivel renal en ovinos alimentados con forrajes en dos estados de madurez.

## 7.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar los efectos de la suplementación energética con grano de cebada o grano de cebada más melaza en ovinos consumiendo una dieta a base de pasturas templadas en diferente estado de madurez sobre:

- 1) La síntesis proteica ruminal.
- 2) El manejo del nitrógeno ureico a nivel renal.

## 8.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1.- LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

El protocolo experimental se desarrolló durante los meses de agosto, setiembre y octubre del año 2005. El trabajo de campo se realizó en la Estación Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria situada en la localidad de Libertad (34° Sur, 55° Oeste), departamento de San José, Uruguay.

Los análisis de composición química de los alimentos ofrecidos se llevaron a cabo en el departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria y los análisis de determinación urinaria de alantoína y funcionalidad renal se realizaron en el departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.

### 8.2. -ANIMALES EXPERIMENTALES

Fueron utilizados 18 (dieciocho) ovinos hembras, vacías y secas raza Corriedale, no esquiladas, de entre 2 y 3 años de edad con un peso de  $43 \pm 4$  Kg. provistas de catéteres yugulares (extracción de muestras sanguíneas) y sondas vesicales con balón de retención para la recolección de orina.

El manejo y cuidado de los animales se realizó bajo la aprobación de la Comisión de Bioética experimental de la Facultad de Veterinaria.

### 8.3.- EXPERIMENTO, TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron dos pruebas de digestibilidad "in vivo" convencional en jaulas metabólicas, para evaluar el efecto de la suplementación con fuentes energéticas de distinta velocidad de degradación sobre dietas a base de pasturas templadas frescas en dos estados de madurez, sobre la funcionalidad renal y producción y eficiencia de síntesis de proteína microbiana.

En cada prueba se utilizó una pastura base en estado vegetativo temprano o vegetativo tardío, y fueron evaluados tres tratamientos:

F = Pastura

FG = Pastura + grano de cebada quebrado

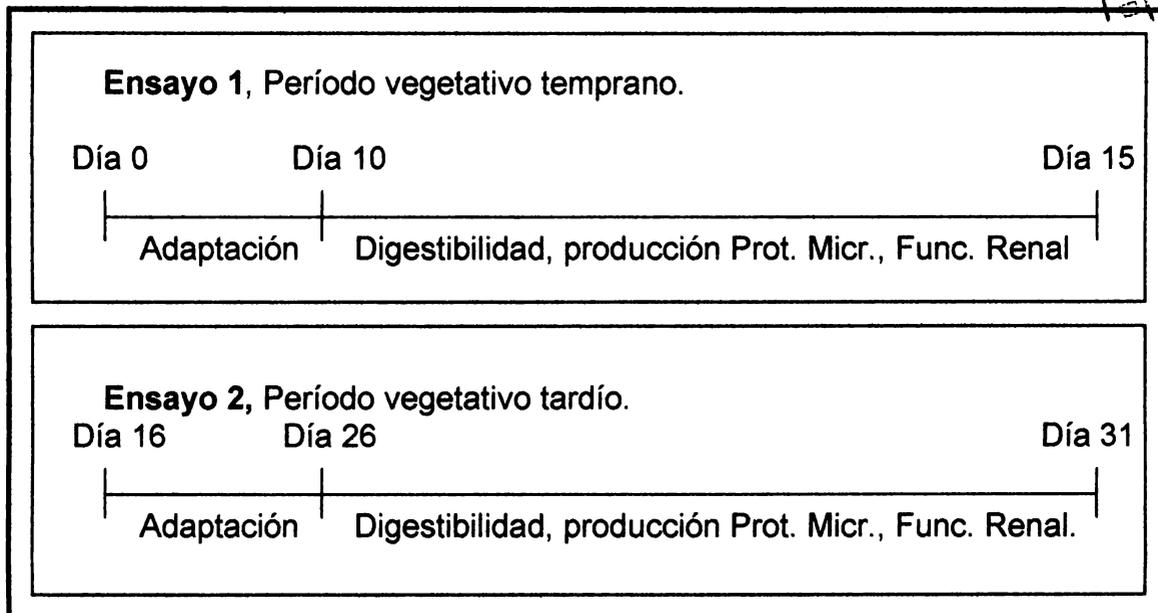
FGM = Pastura + grano de cebada quebrado + melaza deshidratada

El diseño experimental fue factorial 3 x 2 (3 tratamientos 2 muestreos) asignándose en forma aleatoria 6 animales por tratamiento.

### 8.4.- CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO

Para comprobar la hipótesis establecida se condujeron dos ensayos de digestibilidad "in vivo" en jaulas metabólicas, usándose un período de adaptación a las condiciones experimentales de diez días, seguido de cinco días de colección de muestras y determinación de digestibilidad, estudio de funcionalidad renal y estimación de producción de proteína microbiana como se representa en la Figura 1.

Figura 1: Esquema del desarrollo de los protocolos experimentales



## 8.5.- ALIMENTOS Y ALIMENTACIÓN

La dieta base que se suministró a los animales consistió en forraje de pradera templada implantada, 90% de gramíneas (*Avena sativa*) y 10% de trébol blanco (*Trifolium repens*) en dos estadios vegetativos: temprano y tardío. El estadio temprano consistió en un rebrote de entre 15 y 20 días, mientras que el llamado tardío correspondió a un rebrote de aproximadamente 2 meses. La pastura tenía un tiempo de implantación de aproximadamente 4 meses. La suplementación se realizó con grano de cebada (*Hordeum vulgare*) quebrado y melaza deshidratada (derivada de caña de azúcar: Kalori 3000®, KK Animal Nutrition Pty Ltd., Sud África). La composición del alimento ofrecido se presenta en la Tabla I.

Tabla I: Composición química de los alimentos consumidos durante los ensayos experimentales (#)

	Kg MS/há	%MS	%MO*	%Cen*	%FND*	%FAD*	%PB*	%AS*
<b>Forraje Temprano.</b>	3040	14,81	87,71	12,29	54,62	27,87	14,86	8,17
<b>Forraje Tardío.</b>	6240	15,9	88,97	11,3	55,45	29,63	11,62	4,7
<b>Cebada</b>	---	92,41	96,82	3,18	16,11	6,01	8,74	5,3
<b>Melaza **</b>	---	97,02	62,67	37,33	0,86	0,05	8,53	25,00***

(#) Los resultados expresados en esta tabla fueron tomados de la tesis "Digestibilidad y ambiente ruminal en ovinos alimentados con pastura fresca utilizando distintos suplementos energéticos", de las doctoras Victoria Elizondo, Ana Falero y Alicia Pereyra, realizada en el marco del mismo estudio experimental que el presente trabajo. \*: Datos expresados en base a materia seca. AS: azúcares solubles. \*\* Kalori 3000® (46,9% melaza de caña de azúcar + 46,9% de condensados de melaza solubles + 6,2% hidróxido de calcio). \*\*\* Dato proporcionado por el fabricante.

## 8.6.- DESCRIPCIÓN DEL PERÍODO PRELIMINAR

Se estableció un período preliminar de 10 días para la adaptación de los animales a los regímenes alimenticios y a las condiciones de cada ensayo. Se fijó un consumo diario para mantenimiento de 40 g MS/kg PV<sup>0,75</sup> para cada animal, siendo la suplementación energética un 30% de la materia seca ofrecida. El forraje que se suministró fue cortado diariamente por las mañanas, pesado e individualizado en bolsas etiquetadas para cada animal. Fue dado cuatro veces al día en los siguientes horarios: 9, 13, 18 y 23 hrs. Se adicionó el suplemento energético correspondiente a cada tratamiento dos veces al día, con la primera y tercera ingesta de forraje.

## 8.7.- DESCRIPCIÓN DEL PERÍODO DE COLECCIÓN

Durante 5 días, luego de la adaptación para cada ensayo, se procedió a la toma de muestras registrándose diariamente las cantidades de alimento ofrecido y rehusado. Fueron tomadas alícuotas del alimento ofrecido en cada tratamiento para determinar su composición así como muestras de los rechazos mayores al 10% de lo ofrecido. La composición del alimento ofrecido se presenta en la Tabla II.

**Tabla II:** Composición química de cada dieta experimental para ambos ensayos experimentales (E1 y E2).<sup>(#)</sup>

	Grupo.	% MO	% PB	%CHNF	% FND	% FAD
<b>E1,</b> <b>Forraje temprano.</b>	<b>F</b>	87,71	14,86	15,53	54,62	27,87
	<b>FG</b>	90,44	13,03	31,89	43,07	21,31
	<b>FGM</b>	85,32	12,99	29,36	40,78	20,42
<b>E2,</b> <b>Forraje tardío.</b>	<b>F</b>	88,97	11,62	19,2	55,45	29,63
	<b>FG</b>	91,32	10,76	34,46	43,65	22,55
	<b>FGM</b>	86,2	10,73	31,93	41,36	21,65

<sup>(#)</sup>Los resultados expresados en esta tabla fueron tomados de la tesis "Digestibilidad y ambiente ruminal en ovinos alimentados con pastura fresca utilizando distintos suplementos energéticos", de las doctoras Victoria Elizondo, Ana Falero y Alicia Pereyra, realizada en el marco del mismo estudio experimental que el presente trabajo.

## 8.8.- DETERMINACIONES EN EL ANIMAL

### 8.8.1.- Colección de orina

A cada animal se le colocó una sonda vesical con balón de retención, conectada a una bolsa de recolección para evitar la contaminación con materia fecal, donde se colectó el total de la orina emitida diariamente. Se agregaron 15 mL de ácido sulfúrico al 10% para disminuir el pH de la orina, evitando la contaminación bacteriana que degradaría las sustancias a estudiar. Se midió la diuresis diaria, tomando dos alícuotas de 30 mL que se conservaron a -20°C para posterior análisis.

### 8.8.2.- Producción de proteína microbiana

La producción de proteína microbiana se evaluó mediante la dosificación urinaria de alantoína.

Teniendo el volumen de orina emitida diariamente, se trabajó sobre la alícuota obtenida para determinar la alantoína excretada en la orina mediante el método

colorimétrico de Young y Conway, modificado por Fujihara (1987). La producción de proteína microbiana se calculó, a partir del N alantoico eliminado en la orina, utilizando la fórmula propuesta por Puchala y Kulasek (1992):

$$y = e^{(0,830 + 2,089x)}$$

donde “y” representa el N microbiano (g/d) que llega al duodeno y “x” la eliminación de N de alantoína (g/d).

#### 8.8.3.- Eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESM)

La ESM en rumen fue estimada a partir de los g de N microbiano por kg de MODI y/o MODR. Siendo MODI la *Materia Orgánica Digestible Ingerida* calculada como el coeficiente de digestibilidad de la MO x MO ingerida (g). La *Materia Orgánica aparentemente Digestible en Rumen (MODR)* se calculó como 65% de la MODI (ARC, 1984).

#### 8.8.4.- Funcionalidad renal y eliminación de urea

El estudio de la funcionalidad renal se basó en el principio de depuración plasmática (clearance) de una sustancia, el cual establece que el volumen teórico de plasma completamente depurado de una sustancia X por unidad de tiempo es igual a la cantidad de esa sustancia eliminada con la orina en el mismo tiempo.

La concentración plasmática y urinaria de urea se determinó mediante el kit colorimétrico Urea color 2R de Weiner Lab<sup>®</sup>, Rosario, Argentina. Para la determinación de la concentración plasmática y urinaria de creatinina se utilizó el kit colorimétrico Creatinina directa de Weiner Lab<sup>®</sup>, Rosario, Argentina.

#### 8.8.5.- Manejo renal de la urea

El manejo renal de la urea se estudió mediante la determinación de la depuración plasmática de urea ( $C_u$ ), el flujo de filtración glomerular (FFG), la cantidad de urea que filtra ingresando al nefrón; carga filtrada de urea ( $CF_u$ ) y la proporción de la urea filtrada que se elimina con la orina; tasa de eliminación de urea ( $TE_u$ ).

La  $C_u$  se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$C_u \text{ (ml/min)} = [U_u \text{ (mg/ml)} \times V \text{ (ml/min)}] / P_u \text{ (mg/ml)}$$

Donde “ $U_u$ ” es la concentración urinaria de urea, “ $P_u$ ” es la concentración plasmática de urea y “ $V$ ” es la diuresis (volumen de orina emitido en 24 hs).

El FFG se determinó a través del cálculo de la depuración plasmática de creatinina

$$FFG \text{ (ml/min)} = [U_c \text{ (mg/ml)} \times V \text{ (ml/min)}] / P_c \text{ (mg/ml)}$$

Donde “ $U_c$ ” es la concentración urinaria de creatinina y “ $P_c$ ” es la concentración plasmática de creatinina.

La  $CF_u$  se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$CF_u \text{ (mg/min)} = U_u \text{ (mg/ml)} \times FFG \text{ (ml/min)}$$

La  $TE_u$  se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$TE_u = C_u \text{ (ml/min)} / FFG \text{ (ml/min)}$$

## 8.9.- ESTUDIO ESTADÍSTICO

La producción de proteína microbiana y la eliminación urinaria de alantoína fueron analizados como medidas repetidas por el procedimiento PROC MIXED (Sistema de Análisis Estadístico, SAS Institute, Cary NC, USA, 2000). El modelo incluyó tratamiento, período y su interacción. La estructura de covarianza fue auto regresiva orden 1 cuando el efecto tratamiento fue significativo, o mostró una tendencia, los resultados de los diferentes tratamientos fueron comparados usando contraste ortogonal, separando el efecto de la suplementación (F vs FG + FGM) y el suplemento utilizado (FG vs FGM). Los datos se presentan como las medias  $\pm$  el desvío estándar. La significancia estadística mínima fue evaluada a  $P < 0.05$  y fue marcada una tendencia entre 0.05 y 0.1.

Para la uremia, diuresis, flujo de filtración glomerular, clearance de urea, carga filtrada de urea, eliminación urinaria de urea y tasa de eliminación de urea se utilizó ANOVA, donde el modelo incluyó como variables independientes el tratamiento, período y el animal. No se incluyeron interacciones. Se consideran diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ .

## 9.- RESULTADOS

### ELIMINACIÓN URINARIA DE ALANTOÍNA, PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA Y EFICIENCIA DE SÍNTESIS MICROBIANA

Los valores de eliminación urinaria de alantoína, producción de proteína microbiana y de eficiencia de síntesis microbiana en función de MODI y MODR se indican en la Tabla III para los tratamientos de cada ensayo experimental (Forraje temprano E1 y Forraje tardío E2). Si bien no hubieron diferencias significativas entre tratamientos para ninguno de los parámetros que se muestran en la mencionada tabla tanto en E1 como en E2, sí se observa una tendencia al aumento ( $P=0.06$ ) de todos ellos durante E1 frente a los tres grupos en E2. Es decir que durante el período con forraje de mejor calidad todos los parámetros estudiados tienden a ser mayores respecto al período con forraje de menor calidad.

Tabla III: Eliminación urinaria de alantoína (mmol/d), producción estimada de proteína microbiana (PM, g/d) y eficiencia de síntesis microbiana (ESM, g N/Kg de MODI, MODR) para los tres grupos en ambos ensayos (E1 y E2)

	E1 (Forraje temprano)			E2 (Forraje tardío)		
	F	FG	FGM	F	FG	FGM
<b>MODI (g/d)</b>	441±47	489±67	471±22	411±40	458±36	442±29
<b>MODR (g/d)</b>	286±30	318±43	306±14	267±25	298±23	287±18
<b>Alantoína (mmol/d)</b>	10,5±1,3	10,4±1,6	9,9±1,3	7,7±1,2	8,7±1,0	8,9±1,0
<b>PM (g/d)</b>	8,9±1,05	8,6±2,2	8,3±2,2	6,2±0,8	7,0±1,6	6,5±1,1
<b>ESM g N/KgMODI</b>	19,5±2,4	18,2±4,7	17,7±4,3	15,3±1,2	15,0±1,8	14,6±2,1
<b>g N/Kg MODR</b>	30,0±3,7	28,1±7,3	27,2±6,6	23,5±1,9	23,1±2,8	22,5±3,3

Valores = medias  $\pm$  DS,  $n = 6$ . F- forraje como monoalimento, FG- forraje y grano de cebada, FGM- forraje, grano de cebada y melaza. MODI- materia orgánica digestible ingerida, MODR- materia orgánica aparentemente digestible en rumen, PM- proteína microbiana, ESM- eficiencia de síntesis microbiana.

### FUNCIÓN RENAL Y MANEJO DE LA UREA POR EL RIÑÓN

La uremia y la carga filtrada de urea mantienen valores similares en los tres grupos durante E1, encontrándose aumentadas en el grupo FG durante E2 con respecto a los grupos restantes (F y FGM). El FFG (flujo de filtración glomerular), el Cu (clearance de la urea) y la TEu (tasa de eliminación de la urea) demostraron tendencia a incrementarse durante E1, respecto al E2. En la Tabla IV se presentan los valores de uremia y de los parámetros renales involucrados en el manejo de la urea por el riñón comparando entre tratamientos para ambos ensayos. En la Tabla V se observan los mismos valores pero comparando entre los ensayos.

**Tabla IV:** Uremia y manejo renal de la urea, comparada entre los tratamientos en ambos ensayos (E1 y E2).

T	D	Cr U	Cr P	FFG	EUu	Up	Cu	CFu	TEu
<b>FG</b>	1,38 ± 0,42	0,60 ± 0,29	0,01 ± 0,00	71,96 ± 18,14	6,72 ± 4,98	0,27 ± 0,13	31,26 ± 11,60	17,96 ± 5,12	0,44 ± 0,11
<b>FGM</b>	1,64 ± 0,42	0,45 ± 0,09	0,01 ± 0,00	71,90 ± 16,61	3,92 ± 1,32	0,24 ± 0,05	26,48 ± 9,08	17,20 ± 6,35	0,38 ± 0,11
<b>F</b>	1,84 ± 0,60	0,38 ± 0,14	0,01 ± 0,00	66,36 ± 21,42	4,30 ± 2,40	0,24 ± 0,06	30,20 ± 13,59	15,98 ± 7,05	0,46 ± 0,16

*T = tratamiento, D = diuresis, CrU = creatinina urinaria, CrP = creatinina plasmática, FFG = flujo de filtración glomerular, EUu = eliminación urinaria de urea, Up = urea plasmática, Cu = Clearance de urea, CFu = carga filtrada de urea, TEu = tasa de eliminación de urea.*

**Tabla V:** Uremia y manejo renal de la urea comparada entre ambos ensayos experimentales, E1 (vegetativo temprano) y E2 (vegetativo tardío).

Ensayo	D	Cr U	Cr P	FFG	EUu	Up	Cu	CFu	TEu
<b>E1</b>	1,83 ± 0,42	0,43 ± 0,12	0,01 ± 0,00	78,16 ± 13,46	4,65 ± 1,65	0,24 ± 0,06	36,07 ± 10,59	19,18 ± 6,80	0,46 ± 0,12
<b>E2</b>	1,43 ± 0,54	0,49 ± 0,28	0,01 ± 0,00	60,34 ± 19,48	4,92 ± 4,54	0,25 ± 0,10	21,93 ± 7,46	14,64 ± 4,80	0,38 ± 0,13

*D = diuresis, CrU = creatinina urinaria, CrP = creatinina plasmática, FFG = flujo de filtración glomerular, EUu = eliminación urinaria de urea, Up = urea plasmática, Cu = Clearance de urea, CFu = carga filtrada de urea, TEu = tasa de eliminación de urea.*

Los valores de diuresis, flujo de filtración glomerular, clearance de urea, carga filtrada de urea y tasa de eliminación de urea fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) durante el ensayo uno (forraje temprano) respecto al ensayo dos (forraje tardío). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ni en los demás parámetros estudiados comparándose entre ensayos.

## 10.- DISCUSIÓN

### ELIMINACIÓN URINARIA DE ALANTOÍNA, PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA Y EFICIENCIA DE SÍNTESIS MICROBIANAS

Los valores de eliminación urinaria de alantoína encontrados en este trabajo (7.9 – 10.5 mmol/d) son semejantes a los encontrados por otros autores, como Pérez et al., (1997) quienes obtuvieron valores de excreción urinaria de alantoína entre 6.38 y 10.63 mmol/d estudiando ovinos alimentados con diferentes fuentes proteicas y bajo dos niveles de suplementación con cebada. Por otro lado, Trevaskis et al., (2001) obtuvieron valores entre 5.5 y 9.01 mmol/d, los cuales también son similares a los obtenidos en el presente estudio.

Si bien diferentes autores han postulado que la suplementación energética aumenta la eliminación urinaria de bases púricas, como la alantoína (Chen et al., 1992; Balcells et al., 1993; Pérez et al., 1997, Tebot et al. 2004), en este estudio no se encontraron diferencias significativas en la medición de este parámetro entre los grupos suplementados versus los no suplementados. Algo similar fue encontrado por Jetana et al. (2000) quienes no obtuvieron diferencias significativas en la eliminación de alantoína en ovinos recibiendo forraje y suplementados con harina de maíz o pulpa de papel. No obstante se detectó un leve aumento en la eliminación urinaria de alantoína, si comparamos los resultados del E1 (10.3 mmol/d) con los del E2 (8.4 mmol/d). Posiblemente influenciado por el mayor tenor de proteína bruta del forraje temprano respecto al forraje tardío (14.86% vs 11.62% respectivamente).

Algo similar ocurre con la producción diaria de proteína microbiana estimada en gramos por día a partir de la eliminación diaria de alantoína. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (suplementados versus no suplementados), no obstante, durante el E1 hubo un ligero incremento en la producción de proteína microbiana (8.6 g/d) respecto al E2 (6.6 g/d). La causa de estas diferencias se puede atribuir también a la variación en la calidad del forraje ofrecido durante los ensayos. Cabe agregar que los valores encontrados están dentro del rango encontrado por Chen et al., (1992) (4.5 – 9.1 g/d), con la diferencia que estos valores fueron calculados a partir de la medición de la excreción del total de los derivados púricos.

La eficiencia de síntesis de proteína microbiana (ESM) estuvo en valores entre 14.6 – 19.5 g N/Kg de MODI, concordantes con los hallados por Chen et al., (1992) los que señalan una ESM con valores comprendidos entre 12,8 - 15,8 g N/kg de MODI. Tomando la ESM en base a la MODR encontramos valores entre 22.5 – 30.0 g de N microbiano por Kg de MODR, similares a los obtenidos por Pérez et al., (1997) quienes alcanzaron valores de ESM entre 10.9 – 22.2 g de N microbiano por Kg de MODR., estimados a partir de la eliminación urinaria de alantoína.

En nuestro trabajo la suplementación energética con CHONF en niveles de entre 29 y 35% no resultaron en una mayor síntesis de proteína microbiana. Esto concuerda con la sugerido por Hoover et al., (1984) que niveles de suplementación por encima del 37 % optimizan la ESM. Por otra parte, Feng et al., (1993) encontraron que un aumento del 29 al 39% de CHNF en la dieta produjo una disminución en la ESM. Otro factor a considerar es la variación en los alimentos que se engloban bajo el término CHONF, dado que entre ellos existen diferencias en cuanto a las

proporciones de sacarosa, almidones y pectinas, lo que indicaría que un aumento de CHONF de la dieta no necesariamente se traduciría en una mejor ESM (Stern et al., 1994).

Por último, los niveles de suplementación y la naturaleza de los suplementos ofrecidos no se reflejaron en una mejora significativa de la producción de proteína microbiana a nivel ruminal. Sin embargo, al comparar entre ensayos, se observó una tendencia al aumento ( $P = 0.06$ ) de la síntesis de proteína microbiana en el ensayo donde se ofreció forraje en estado vegetativo temprano respecto al ensayo donde se ofreció forraje en estado vegetativo tardío. El promedio de aporte en PB del alimento ofrecido durante el ensayo uno fue de 13.63 % (promedio de los aportes en PB de los tres tratamientos) contra un 11.04 % del ensayo dos. Esto demuestra que durante el primer ensayo el aporte de N fue mayor, lo que en parte explicaría la tendencia antes mencionada. Por lo tanto en nuestro trabajo tuvo mas influencia en la producción de PM la calidad del forraje ofrecido que la naturaleza y nivel de suplementación energética.

## UREMIA Y CONTRIBUCIÓN RENAL PARA SU MANTENIMIENTO

La suplementación con concentrados energéticos mejora la eficiencia de utilización del N del forraje por parte de los mo ruminales, disminuyendo la concentración plasmática de urea (Obara et al., 1991; Bargon et al., 2002; Noro et al., 2006). Tebot et al., (2004) trabajando en ovinos alimentados con pellets de alfalfa y suplementados con maíz obtuvieron una reducción de la uremia en con un aumento en la producción de proteína microbiana.

Comparando los tratamientos entre sí no se evidencian reducciones de la uremia atribuibles a la suplementación energética ni mecanismos de acción renal que contribuyan a disminuir la pérdida urinaria de urea para mantener el pool sanguíneo normal de urea para su reciclaje hacia el rumen.

## 11.- CONCLUSIÓN

No se observó un incremento en la captación de N por parte de los mo ruminales ni un aumento de la producción de proteína microbiana a los niveles de suplementación con CHONF empleados en este trabajo (30 % de MS del alimento ofrecido).

Sin embargo, al comparar los dos ensayos experimentales entre sí, forraje temprano (E1) versus forraje tardío (E2), observamos una tendencia al aumento ( $P = 0.06$ ) de la producción de proteína microbiana en E1 (8.6 g/d) respecto a E2 (6.6 g/d). Los niveles de N del forraje ofrecido fueron de 14.86 % y de 11.62 % para E1 y E2 respectivamente. Estas diferencias pueden explicar la mencionada tendencia.

Dada la calidad de la pastura ofrecida los mo ruminales no necesitaron de suplementación energética para optimizar la utilización del N ofrecido, utilizando el mismo en mayor medida para el mantenimiento que para la reproducción microbiana.

Por lo tanto, podemos concluir que en este estudio tuvo mayor influencia la calidad del forraje que el nivel y la naturaleza del suplemento energético ofrecido, dando una pauta del valor y la importancia de la calidad de las pasturas en la producción ovina.

## 12.- BIBLIOGRAFÍA

1. Amin M.R., Onodera R. (1997). Synthesis of phenylalanine and production of other related compounds from phenylpyruvic acid and phenylacetic acid by ruminal bacteria, protozoa, and their mixture in vitro. *J.Gen. Appl.Microl.* 43:9-15.
2. Antúnez M.; Caramelli A.; Britos A.; Zanoniani R.; Repetto J.L.; Boggiano P.; Cajarville C. (2007). Efecto del momento del día y del tipo de metabolismo fotosintético sobre el contenido de azúcares solubles en diferentes especies forrajeras. Año LXVII Vol. 42 N° 168.
3. A.R.C. (Agricultural Research Council) (1984). The nutrient requirements of ruminant livestock, Common-wealth Agricultural Bureaux, Slough, England, 45 pp.
4. Atasoglu C., Guliye A. Y, Wallace R. J.. (2004) Use of stable isotopes to measure de novo synthesis and turnover of amino acid-C and 15N in mixed micro-organisms from the sheep rumen in vitro. *Br. J. Nutr.* 91:235-26
5. Bach, A.; y Calsamiglia, S. (2006). La fibra en los rumiantes: .Química o Física?. En: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, Curso de Especialización XXII. FEDNA, Barcelona. p 99-103.
6. Balcells J., Fondevila M., Guada J.A., Castrillo, Surra J.C.E. (1993). Urinary excretions of purine derivatives and nitrogen in sheep given straw supplemented with different sources of carbohydrates. *Anim. Prod.*57: 287-292.
7. Bargo F., Muller L.D., Delahoy J.E., Cassidy T.W. (2003). Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J Dairy Sci* 85, 1777-92.
8. Beever D.E. (1993) Rumen function. En: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Forbes J.M., France J. (1993) Ed. CAB Int. Univ. Press Cambridge, U.K.
9. Beever, D.E. & Siddons, R.C. (1986). Digestion and metabolism in the grazing ruminant. En: Control of Digestion and Metabolism in Ruminants, Proceedings of an International Symposium held in Banff, Canada, 10–14th September, 1984, pp. 479–497 [L.P.Milligan, W.L. Grovum and A. Dobson, editors]. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall.
10. Beauchemin, K.A.; McCallister, T.A.; Dong, Y.; Farr, B.I.; Cheng, K.J. (1994). Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. *Journal of Animal Science*, 72, 236-246.
11. Broudicou L., Jouany J.P. (1995). Reassessing the manipulation of protein synthesis by rumen microbes. *Reprod.Nutr.Develop.* 35:517-535.

12. Bryant M. P., (1973) Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed Proc*; 32:1809-1813.
13. Buxadé, C. (1995). *Reproducción y alimentación*. Madrid, España. Mundi-Prensa Libros. 344 p.
14. Cajarville, C.; Curbelo, A.; Errandonea, N.; Alonso, M.; Aguerre, M.; Repetto, J.L. (2000) Efectos de la suplementación con diferentes granos sobre el ambiente ruminal de bovinos a pastoreo. I: pH ruminal y cinética de degradación de distintos forrajes. En: *Congreso Mundial de Buiatría XXI*, Punta del Este, Uruguay, p. 146.
15. Calsamiglia, S. (1997). Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas para rumiantes. En: *Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal Curso de Especialización: Avances en Nutrición y Alimentación Animal XV*. FEDNA, Madrid. 16p.
16. Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Devant, M. (2002). Effect of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *Journal Dairy Science*. 85: 574-579.
17. Calsamiglia S, Castillejos M., Busquet M. (2005) Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacunos lecheros. *XXI Curso Actualización FEDNA*, Madrid.
18. Cangiano, A. (1997). *Producción animal en pastoreo*. Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce. Argentina.
19. Carro D. M., Miller E. L..(1999). Effect of supplementing a fiber basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an in vitro semi-continuous culture system (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 82:149-157.
20. Castillo, F. y Roldán, M.D. (2005). *Biotecnología ambiental*. Editorial Tebar, Madrid. España. 614 p.
21. Chen X.B., Abdulrazak S.A., Shand W.J., Oskorv E.R. (1992). The effect of supplementing straw with barley or unmolassed sugar-beet pulp on microbial protein supply in sheep estimated from urinary purine derivative excretion. *Anim Prod*. 55:413-417.
22. Cheng K.J., Costerton J.W. (1980). Adherent rumen bacteria: their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. En: Ruckebusch Y., Thivend P. (1980) *Digestive physiology and metabolism in ruminant*. MTP Press, Lancaster pp 227-250.
23. Cheng, K. J.; Forsberg, C.W.; Minota, H.; Costerton, J.W. (1991). Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. En: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima R. (eds.). Academic Press, Toronto. p. 595-624.

24. Chessson, A. ; Forsberg, C.W. (1988). Polysacharide degradation by rumen microorganisms. En: P.N. Hobson. The rumen microbial ecosystem. Elsevier, NY. p. 251-284.
25. Christen, H. (1977). Química general. Barcelona, España. Ed. Reverté, 241p.
26. Clark J. H., Klusmeyer T. H., Cameron M. R. (1992). Microbial Protein Synthesis and Flows of Nitrogen Fractions to the Duodenum of Dairy Cows. J Dairy Sci 75: 2304-2323.
27. Cruz Soto R., Muhammed S. A., Newbold C. J., Stewart C. S., Wallace R. J. (1994). Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay on the growth of rumen bacteria in vitro. Anim. Feed Sci. Technol. 49:151-161.
28. de Blas, C.; Rebollar, P.G.; Mendez, J. (1995) Utilizacion de Cereales en Dietas de Vacuno Lechero. En: Fundacion Espanola para el Desarrollo de la Nutricion Animal. Curso de Especializacion XI. FEDNA, Barcelona. 18p.
29. Demeyer D., Van Nevel C.J. (1986) Influence of substrate and microbial interaction on efficiency of rume microbial growth. Reprod.Nutr. Dev 26:161-179.
30. Dijkstra J., France J., Davies D. (1998). Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. J Dairy Sci 81: 3370-3384.
31. Elias, A. (1983). Digestión de pastos y forrajes tropicales. En: Los pastos en Cuba. Instituto de Ciencia Animal. Cuba. p. 187-247.
32. 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 Animal Science. 77:457-466.
33. Elizalde J.C., Santini F.J., Pasinato A.M. (1996) The effect of stage of harvest on the process of digestion in cattle fed winter oats indoors II. Nitrogen digestion and microbial protein synthesis. Anim. Feed. Sci. Technol. 64:245-255.
34. Erasmus L.J., Botha P.M., Cruywagen C.W. (1994) Aminoacid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs. J. Dairy Sci.77:541-551.
35. Fahey, G.C.; Berger, L.L.; (1988). Los Carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. En: C.D. Church. El Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza. Acribia. p. 305-337.
36. Feng P., Hoover W.H., Miller T.K., Blauwiekel R. (1993). Interactions of fiber nonstructural carbohydrates on lactation and ruminal function. J. Dairy Sci. 80: 1426.

37. Firkins J. (1996). Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. En: *Altering Ruminant Nitrogen Metabolism to Improve Protein Utilization* 36<sup>th</sup> Annual Ruminant Nutrition Conference pp1347-1354.
38. Forsberg, C.W.; Cheng, K.J. (1992). Molecular strategies to optimize forage and cereal digestion by ruminants. En: *Biotechnology and Nutrition*. Bills, D. y Kung, S.B. (eds.) Butterworth-Heinemann. Stoneham, MA. USA. p. 109-147.
39. Forsberg C. W., Lam, K (1977). Use of adenosine triphosphate as an indicator of the microbial biomass in rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:528-537.
40. French, D. (1984). En: *Starch Chemistry and Technology*. Academic Press, New York. pp: 183.
41. Fujihara, T., Orskov, E.R., Reeds, P.J., Kyle, D.J., (1987). The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. Agric. Sci. (Camb)* 109:7-12
42. García, F.; Roselló, J.; Santamarina, M. (2006). *Introducción al funcionamiento de las plantas*. Valencia, España. Editorial de la UPV. 183p.
43. Hacker, J. B. (1981). *Nutritional Limits to Animal Production*. Proc. Int Symp. St. Lucia, Queensland, Australia. CAB, UK.
44. Hall, M.B. (2002). Working with sugars (and molasses). En: *Proc. Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, 13th*. Gainesville, FL. p.146 –158.
45. Henning, P. H., D. G. Steyn, and H. H. Meissner. (1991). The effect of energy and nitrogen supply pattern on rumen bacterial growth in vitro. *Anim. Prod.* 53:165-175.
46. Herrera-Saldana, R.; Gomez-Alarcon, R.; Torabi, M.; Huber, J.T. (1990). Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *Journal Dairy Science.* 73: 142.
47. Hoffman, K., Chase, L., Soder, KJ (2010). Molasses as the primary energy supplement on an organic grazing dairy farm. In: *Proceeding 4th Grazing Livestock Nutrition Conference*. Estes Park, CO. p. 203.
48. Hoover W.H., Stokes S.R., (1991). Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci;* 74: 3630-3644.
49. Hoover W.H., Kincaid C.R., Varga G.A., Thayne W.V., Junkins L.L. (1984). Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *J. Anim. Sci.* 58: 692-699.
50. Hungate, R.E. (1966). *The rumen and its microbes*. Academic Press, Inc., New York. 533 p.

51. Huntington G.B., 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75: 852-867.
52. INIA (2004). Guía para la alimentación del rumiante. Ed. Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA. Serie técnica N° 142, INIA La Estanzuela. 84 p.
53. INIA (2007). Programa nacional de investigación pasturas y forrajes.
54. Jetana T., Abdullah N., Halim R.A., Jalaludin S., Ho Y.W. (2000). Effects of energy and protein supplementation on microbial-N synthesis and allantoin excretion in sheep fed guinea grass. *Anim, Feed. Sci. Technol.* 84:167-181.
55. Jung, H.G.; Allen, M.S. (1995). Characteristics of plant cell wall affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal Animal Science.* 73: 2774-2790.
56. Kernick, B. L. (1991). The effect of form of nitrogen on the efficiency of protein synthesis by rumen bacteria in continuous culture. Ph.D. Thesis, University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa.
57. Maeng W. J., Baldwin R. L. (1976). Dynamics of fermentation of a purified diet and microbial growth in the rumen. *J. Dairy Sci.* 59:636-642.
58. Matras J., Bartle S. J. , Preston R. L. (1991). Nitrogen utilization in growing lambs: Effects of grain (starch) and protein sources with various rates of ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 69:339-347.
59. Mc Allister T.A., Phillippe R.C, Rode L.M., Cheng K.J. (1993). Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminant microorganisms *J. Anim. Sci* 71:205-212.
60. McDonald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J.F.D. y Morgan, C.A. (2002). *Nutrición Animal.* 6a ed. Acribia, Zaragoza, España. 587p.
61. Mertens, D.R. (1973). Application of theoretical mathematical models to cell wall digestion and forage intake in ruminants. Ph. D. Thesis. Cornell University, Ithaca.NY. 105p.
62. Mertens, D.R. (1994). Regulation of forage intake. En: Forage quality, evaluation and utilization, Jr. G.L Fahey, M. Collins, D.R. Mertens, L.E Moser (eds.). American Society of Agronomy, Crop Science. Society of America and Soil Science of America. Madison WI. p. 450-493
63. Millot, J. C.; Risso, D y Methol, R. (1987). Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay. Consultora FUCREA. Comisión Honoraria del Plan Agropecuario. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Uruguay.

64. Minato H., Endo A., Higuchi M., Ootomo Y., Vermura, T. (1966). Ecological treatise on the rumen fermentation. I. The fractionation of bacteria attached to the rumen digesta solids. *J gen. Microbiol.* 22:259-276.
65. Minson, D. J. (1981). Effects of chemical and physical composition of herbage eaten upon intake. En: *Nutritional limits to animal production from pastures proceedings of an international symposium held at Sta. Lucia.* J.R. Hacker (ed.). Queensland, Australia. p. 187-197.
66. Mora Brautigan I. (1991). *Nutrición Animal.* Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. 121 p.
67. Napoli, G.M.; Santini, F.J. (1987). Dinámica de la digestión ruminal de forrajes frescos. *Revista Argentina de Producción Animal.* 7:431-443.
68. Newbold J. R., Rust S. R. (1992). Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. *J. Anim. Sci.* 70:538-546.
69. Nocek J.E., Russell J.B. (1988) Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:2070-2107.
70. Nocek, J.E.; Grant, A.L. (1987). Characterization of in situ nitrogen and fiber digestion and bacterial nitrogen contamination of hay crop forages preserved at different dry matter percentages. *Journal Animal Science.* 64: 552.
71. Noro M., Vargas V., Pulido R.G., Wittwer F. (2006). Efecto del tipo de concentrado sobre indicadores sanguíneos del metabolismo de energía y de proteína en vacas lecheras en pastoreo primaveral. *Arch.Med. Vet.* 38:227-232.
72. Noro M., Wittwer F. (2003). Utilidad de la determinación de urea en la leche. *Vetermas* 2:2-5.
73. NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC
74. Obara, Y.; Dellow, D.W.; Nolan, J.V. (1991). The Influence of Energy-Rich Supplements on Nitrogen Kinetics in Ruminants. En: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminal.* International symposium on ruminal physiology, XII. Academic Press Limited. N.Y. 22: 515-537.
75. Ørskov, E.R.; Ryle. M. (1998). *Energy nutrition in ruminants.* Chalcombe Publications, Lincoln. 524p.
76. Ørskov E.R. (1992) *Protein nutrition in ruminants.* Academic Press Limited. 24-28 Oval Road, London NW1 7DX, UK.

77. Osbourn, D.F.; Terry, R.A.; Outen, G.E.; Cakmmell, S.B. (1974). The significance of a determination of cell walls as the rational basis for the nutritive evaluation of forages. *Proc. Int. Grassl. Congress*12o. Moscow. 3:274.
78. Owens, V. N.; Albrecht K. A.; Muck, R. E.; Duke, S. H. (1999). Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total nonstructural carbohydrates. *Crop Science* 39:1873-1880.
79. Parra, R; Combellas, J.; Gonzalez, E. (1972). Composición y valor nutritivo de forrajes producidos en el trópico. 2. fracciones químicas que afectan la disponibilidad de los componentes fibrosos. *Agron. Trop.* 22: 219-230.
80. Parson, A. J. and Penning, P. D. (1988). The effect of the duration of regrowth on photosynthesis, leaf death and the average rate of growth in a rotationally grazed sward. *Grass Forage Sci.* 43:15-27.
81. Pérez, A. (2006). pH, amoníaco y producción de proteína microbiana en el rumen de corderos, según el horario de corte de la pastura consumida. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay. 36p.
82. Pérez, A.; Repetto, J L; Britos, A; Aguerre, M.; Alonso, M.; Gómez, X.; Pérez, A. L.; Cazzuli, G.; Garín, D.; Cajarville, C. (2006). Ruminant pH of lambs, heifers and cows fed temperate pastures depending on its time of cut. En: Simposio Internacional & 6° Conferencia de Cojeras en Rumiantes. XIV. Colonia, Uruguay. 3p.
83. Pérez J.F., Balcells J., Guada J.A., Castrillo C., (1997). Rumen microbial production estimated either from urinary purine derivative excretion or from direct measurements of 15N and purine bases as microbial markers: effect of protein source and rumen bacteria isolates. *J. Anim. Sci.*, 65: 225-236.
84. Phillips, M. W., Gordon G. L. R. (1995) Composition chimique des protozoaires et des bactéries libres du rumen de vaches . *Anim. Res.* 44 Suppl. 1: 141.
85. Pigurina, G.; Methol, M. (2004). Guía para la alimentación de rumiantes. Serie Técnica INIA La Estanzuela, 142: 1-6.
86. Puchala, R. Kulasek, G.W. (1992) Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. *Can. J. Anim. Sci.*, 72:821-830
87. Pulido R.G., Balocchi, O., Fernandez, J. (2001) Efecto del nivel de producción de leche sobre el comportamiento ingestivo en vacas lecheras en pastoreo invernal. *Arch. Med. Vet* 33,137-144
88. Russell J.B., Wilson D.B., (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH?. *J Dairy Sci*; 79: 1503-1509.

89. Rearte, D.H.; Santini, F.J. (1989) Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. *Revista Argentina de Producción Animal*. 9: 93-105.
90. Repetto, J.L.; Mota, M.; Marinho, P.; Vega, L.; Cajarville, C. (2000) pH ruminal y cinéticas de degradación del forraje en bovinos que pastorean praderas suplementadas o no con concentrados energéticos. *Reunión Latinoamericana de Producción Animal, XVI, Montevideo, Uruguay*. c.c.4.1
91. Repetto, J.L.; Cajarville, C.; D' Alessandro, J.; Curbelo, A.; Soto, C.; Garin, D. (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixture. *Animal Research*. 54:1-8.
92. Sacido, M.B, F.K. Loholaberry y E. Latorre (2004). Dinámica de la oferta en pasturas naturales posquemada: cantidad y calidad. *Arch. Zootec*. 53:153-164.
93. Sacido, M., L.O. Hidalgo y M. Cauhépé. (1995b). Efecto del fuego y la defoliación sobre el valor nutritivo de matas de paja colorada (*Paspalum quadrifarium*). *Rev. Arg. Prod. Animal*, 15: 142-146.
94. Sinclair K.D., Sinclair L.A., Robinson J.J. (2000). Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptative changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. *J Anim Sci* 78:2659-2669.
95. Sniffen C. J., Robinson P. H. (1987). Microbial growth and flows as influenced by dietary manipulations. *J. Dairy Sci*. 70 : 425-441.
96. Stokes, S.R.; Hoover, W.H.; Miller, T.K.; Manski, R.P. (1991). Impact of carbohydrate and protein levels on bacterial metabolism in continuous culture. *Journal Dairy Science*. 74:860-870.
97. Stern M.S., Calsamiglia S., Endres M.I., (1994). Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. En: X Curso de Especialización FEDNA, Madrid.pp177-194.
98. Stern, M. D., Hoover W. H. (1979). Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. *J. Anim. Sci*. 49:1590-1603
99. Sutton, J.D. (1977). Rumen function and the utilisation of readily fermentable carbohydrates by dairy cows. *Prod. Anim Trop* 1977 04:01.
100. Sutton, J. D.; Phipps, R.H.; Cammell, S. B; Humphries, D. J. (2001). Attempts to improve the utilization of urea-treated wholecrop wheat by lactating dairy cows. *Journal Animal Science*. 73:137-147.
101. Tamminga, S., C. J. Van der Koelen and A. M. Van Vuuren (1979). The effect of the level of feed intake on nitrogen entering the small intestine of dairy cows. *Livestock Prod. Sci*. 6:255.

102. Tebot I., Ibarra A.L., Purtscher F., Cirio A. (2004). Influence of energy supply on microbial protein synthesis and renal handling in Corriedale sheep. *J. Anim. Feed Sci.*, 13:223-226.
103. Trevaskis L.M., Fulkerson, W.J, Gooden, J.M. (2001). Provision of certain carbohydrate-based supplements to pasture-fed sheep, as well as time of harvesting of the pasture, influences pH, ammonia concentration and microbial protein synthesis in the rumen. *Aust.J Exp. Agr.* 41:21-27.
104. Ulyatt M.J., Mc Rae J.C., Clarke R.T. y Pearce P.D., (1975) Quantitative digestion of fresh herbage by sheep. IV. Protein synthesis in the stomach. *J. Agr. Sci., Camb*, 84: 453-458.
105. Van Soest, P.J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2oed.. Cornell University Press, Ithaca. 476p.
106. Van Soest, P. (1982) *Nutritional ecology of the ruminant* O & B Books, Corvallis, Oregon, USA, 374 p.
107. Van Soest, P. J.; Wine, R. H. (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds, IV. Determination of plant cell wall constituents. *Journal Association Official Analytic Chemistry*.
108. Van Vuuren A.M., Tamminga S., Ketelaar R.S., (1990). Ruminal availability of nitrogen and carbohydrates from fresh and preserved herbage in dairy cows. *Neth. J. Agric. Sci*; 38: 49-512
109. Varga, G.A.; Kolver, E.S. (1997) Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. En: *Conf. New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants*. *Journal Nutrition*. 127:819-823.