

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**pH, AMONÍACO, ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA
MICROBIANA EN EL RUMEN DE CORDEROS, SEGÚN EL HORARIO DE CORTE DE
LA PASTURA CONSUMIDA**

por

Analía PÉREZ RUCHEL

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
(Orientación Higiene, Inspección, Control
y Tecnología de los Alimentos)

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2006**

045 TG
PH, amoníaco, á
Pérez Ruchel, Analía



FV/26844

TESIS aprobada por:

Presidente de Mesa:

Roberto Kremer

Nombre completo y firma



Segundo Miembro (Tutor):

Cecilia Cajaville

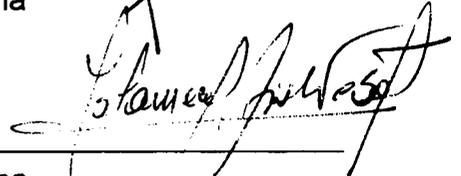
Nombre completo y firma



Tercer Miembro:

Islamey Tebot

Nombre completo y firma



Co-tutor:

José Luis Repetto

Nombre completo y firma



Fecha:

Autor:

Analía Pérez Ruchel

Nombre completo y firma



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar con palabras mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron que este trabajo fuera posible:

A mi familia, por su apoyo incondicional.

A los Drs. Cecilia Cajarville y José L. Repetto, por la confianza que depositaron en mí, por su tutoría y colaboración.

A todos los demás integrantes y amigos del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria (Martín Aguerre, Alejandro Britos, Sebastián Brambillasca, Santiago Monteverde y Daniel Garín), por su ayuda permanente en cada actividad realizada y principalmente por bancarme cada día.

A Ana Laura Pérez, Ximena Gómez, Guillermo Cazulli y Mauricio Alonso, por su participación en las actividades de campo.

A la Dra. Islamey Tebot, por su asistencia técnica.

A la Dra. Cristina Arakaki (INTA Castelar, Argentina), por los análisis realizados en su instituto.

Al personal del Campo Experimental N°2 (Libertad) de la Facultad, por su colaboración en la puesta a punto del diseño experimental.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. AMBIENTE RUMINAL.....	3
3.1.1. <u>pH</u>	3
3.1.2. <u>Nitrógeno Amoniacal</u>	5
3.1.3. <u>Ácidos Grasos Volátiles</u>	7
3.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA EN RUMEN.....	8
3.3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE LOS FORRAJES TEMPLADOS.....	10
4. HIPÓTESIS	10
5. OBJETIVOS	
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	11
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1. ANIMALES, DIETAS Y TRATAMIENTOS.....	11
6.2. MEDICIONES Y CÁLCULOS REALIZADOS	
6.2.1. <u>Composición Química de la Pastura y Heces</u>	13
6.2.2. <u>Consumo</u>	13
6.2.3. <u>Materia Orgánica Digestible Ingerida</u>	13
6.2.4. <u>Ambiente Ruminal</u>	
6.2.4.1. <u>pH</u>	14
6.2.4.2. <u>Nitrógeno Amoniacal</u>	14
6.2.4.3. <u>Ácidos Grasos Volátiles</u>	14
6.2.5. <u>Alantoína y Producción de Proteína Microbiana</u>	14
6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	15
7. RESULTADOS	
7.1. EVOLUCIÓN DIURNA DE LOS AZÚCARES SOLUBLES DE LA PASTURA OFRECIDA.....	15
7.2. CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD APARENTE.....	16
7.3. AMBIENTE RUMINAL	
7.3.1. <u>pH</u>	16

7.3.2. <u>Nitrógeno Amoniacal</u>	18
7.3.3. <u>Ácidos Grasos Volátiles</u>	19
7.4. <u>ALANTOÍNA Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA</u>	22
8. <u>DISCUSIÓN</u>	
8.1. pH RUMINAL.....	23
8.2. NITRÓGENO AMONIACAL RUMINAL.....	24
8.3. ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES.....	25
8.4. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA EN RUMEN.....	27
9. <u>CONCLUSIONES</u>	29
10. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	30

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Página

Tabla I. Composición química de la pastura consumida por los animales al inicio del diseño experimental.....	12
Tabla II. Contenido de azúcares solubles (CHS), nitrógeno (N) y su relación, según el horario de corte de la pastura consumida por los animales (M o T) y el período experimental (I, II o III).....	15
Tabla III. Ingesta y digestión de MS y MO en corderos alimentados con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T).....	16
Tabla IV. Valores medios de pH ruminal y concentración de N-NH ₃ en el líquido ruminal de corderos alimentados con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T).....	17
Tabla V. Concentración de AGVt e individuales en el fluido ruminal de corderos alimentados con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T).....	20
Tabla VI. Excreción urinaria de alantoína, N mo y eficiencia de síntesis microbiana, en corderos alimentados con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T).....	23
Figura 1. pH ruminal en corderos alimentados de mañana o de tarde.....	17
Figura 2. Concentración de N-NH ₃ en el líquido ruminal de corderos alimentados de mañana o de tarde.....	18
Figura 3. pH y concentración de N-NH ₃ en el fluido ruminal de corderos alimentados durante la mañana (M) o la tarde (T).....	19
Figura 4. Concentración de AGVt e individuales (Acético: A, Propiónico: P, Butírico: B) en el líquido ruminal de corderos alimentados de mañana (-M-) o de tarde (-T-).....	21
Figura 5. Evolución diurna del pH y concentración de AGVt en corderos alimentados durante la mañana (-M) o la tarde (-T).....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

aa: aminoácidos

AGVt: ácidos grasos volátiles totales

AGV: ácidos grasos volátiles

BP: bases púricas

CH: carbohidratos

CHE: carbohidratos estructurales

CHNE: carbohidratos no estructurales

CHS: carbohidratos solubles (azúcares) o fácilmente fermentescibles

E: energía

FAD: fibra ácido detergente

FND: fibra neutro detergente

kg^{0.75}: kg de peso metabólico

M: forraje cortado y ofrecido en la mañana (tratamiento M)

MN: materia nitrogenada

mo: microorganismos

MO: materia orgánica

MODI: materia orgánica digestible ingerida

MODR: materia orgánica aparentemente digerida en rumen

MS: materia seca

N mo: nitrógeno microbiano

N: nitrógeno

N-NH₃: nitrógeno amoniacal

PB: proteína bruta

P.V: peso vivo

PM: proteína microbiana

T: forraje cortado y ofrecido en la Tarde (tratamiento T)

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del horario de corte sobre el ambiente ruminal de animales consumiendo pasturas templadas. En este estudio 5 corderos alojados en jaulas metabólicas consumieron una pastura fresca cortada a la hora 7:00 (M) o 18:00 (T) e inmediatamente ofrecida durante 3 períodos. Muestras de líquido ruminal extraídas a cada hora durante 24 horas fueron analizadas para pH, amoníaco y ácidos grasos volátiles. A partir de la eliminación de alantoína urinaria diaria se estimó indirectamente la producción de nitrógeno microbiano y su eficiencia de utilización. Los datos fueron analizados estadísticamente como medidas repetidas usando un modelo mixto. El pH ruminal resultó inferior, y los ácidos butírico, valérico y caproico superiores, para T, con mínimos valores de pH para M (5.6) y T (5.44) a 4 y 2 horas luego del comienzo de la comida, respectivamente, y máximos valores de amoníaco de 32.57 y 29.24 mg/dl (M y T respectivamente) a 4 horas del comienzo de la comida para ambos tratamientos. La eliminación de alantoína no fue afectada por los tratamientos, aunque, el bajo pH y mayores concentraciones de butírico, observados para T, sugieren que la fermentación ruminal pudo haber sido mejorada.

Palabras clave: pastura, pH ruminal, amoníaco, ácidos grasos volátiles, alantoína.

2. SUMMARY

The aim of this work was to determine the effect of the timing of cut on ruminal environment of animals consuming temperate pastures. In this study 5 lambs housed in metabolic cages consumed fresh pasture cut at 7:00 (M) or 18:00 h (A) and immediately offered during 3 periods. Samples of ruminal liquor extracted each hour during 24 hours were analyzed for pH, ammonia and volatile fatty acids. Microbial nitrogen production and its utilization efficiency were indirectly estimated by daily urinary allantoin elimination. Data was statistical analyzed as repeated measures using a mixed model. Ruminal pH was lower, and the butyric, valeric and caproic acids were higher for A, with minimum pH values for M (5.6) and A (5.44) registered 4 and 2 hours after the meal beginning respectively, and maximum values of ammonia 32.57 and 29.24 mg/dl (M and A, respectively) 4 hours after the meal beginning, for both treatments. The allantoin elimination was not affected by treatments, although, lower pH and higher butyric concentrations, observed for A, suggest that ruminal fermentation could be improve.

Key words: pastures, ruminal pH, ammonia, volatile fatty acids, allantoin.

3. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes a partir de la fermentación ruminal son capaces de convertir la fibra de los alimentos y proteínas de baja calidad, al igual que el nitrógeno no proteico, en nutrientes valiosos para ellos mismos, (Dewhurst et al., 2000). Complejas interacciones entre el forraje, los microorganismos (mo) del rumen y el animal huésped les confieren esa habilidad. Un óptimo ambiente ruminal, que favorezca la actividad microbiana, podría maximizar dichos procesos (Rearte y Santini, 1989).

La alimentación de los rumiantes en Uruguay se basa principalmente en la utilización de forrajes frescos a través del pastoreo directo durante todo el año. Trabajos realizados en el Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria (Uruguay) muestran que, el ambiente ruminal de animales consumiendo praderas templadas de alta calidad es diferente del que sería un ambiente ruminal óptimo (Cajarville et al., 2000). Además, se observaron diferencias en la composición de la pastura a lo largo del día (Repetto et al., 2003a). Dichos aspectos hacen de interés determinar las repercusiones que ésto pueda tener tanto en la actividad bacteriana y digestibilidad del forraje como en la producción de proteína microbiana (PM) a nivel ruminal.

3.1. AMBIENTE RUMINAL

Dentro del estudio del ambiente ruminal, se consideran algunos parámetros tales como el pH y las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y ácidos grasos volátiles (AGV).

3.1.1. pH

El pH ruminal es un importante regulador de los procesos digestivos. Presenta un amplio rango de valores que pueden variar desde menores de 5 hasta mayores de 7, con continuas fluctuaciones a lo largo del día. Estas fluctuaciones se producen en función del tipo de dieta, frecuencia de alimentación y nivel de ingesta, entre otros (Cerrato et al., 2005). La mayoría de las bacterias del rumen exhiben una óptima actividad y crecimiento cuando el pH ruminal alcanza valores de 6.0 a 6.9 (Van Soest, 1994). Por lo tanto, las fluctuaciones de pH pueden afectar a la flora microbiana y, por ende, a la fermentación ruminal.

Para mantener su pH dentro de valores normales, el rumen cuenta con tres sistemas buffer: el del bicarbonato, el de los fosfatos y el de los AGV. En general, permanece bien amortiguado por el del bicarbonato que es aportado principalmente por las

secreciones salivares (Rearte y Santini, 1989). No obstante, en algunas ocasiones, los productos ácidos de la fermentación exceden esta capacidad buffer, produciendo un gran descenso del pH ruminal. Esta situación podría derivar en la disminución de la función ruminal e incluso de la performance del animal, según la gravedad del caso (Russell y Hespell, 1981).

Asimismo, la acidificación del medio ruminal puede ser la limitante para la digestión de las paredes celulares de los forrajes. Frente a un bajo pH ruminal, tanto en estudios *in situ* (Tripathi et al., 2004) como *in vitro* (Mouriño et al., 2001), se demostró que la actividad celulolítica y la digestibilidad de la fibra son reducidas, así como también las reacciones de desaminación (Jouany y Martin, 1997; Martin et al., 1999). Van Soest (1994) afirma que cuando el pH ruminal alcanza valores inferiores a 6.0 es deprimida la actividad de los mo. fermentadores de carbohidratos estructurales (CHE), cuyos niveles son elevados con dietas forrajeras. Por el contrario, las bacterias que fermentan carbohidratos solubles (azúcares) o fácilmente fermentescibles (CHS) persisten aún con valores de pH de 4.6 a 4.9. No obstante, estudios tempranos concluyeron que un pH reducido no causa la muerte de bacterias, sino una reducción transitoria de su actividad y crecimiento (Russell y Dombrowski, 1980). Hoover (1986) indicó que la reducción cíclica del pH ruminal por debajo de 6.2 podría causar una disminución moderada y transitoria de la digestión de la fibra siempre que los períodos fueran de corta duración. Por el contrario, una disminución del pH durante tiempos prolongados inhibiría considerablemente el crecimiento de las bacterias fibrolíticas y con ello la digestión de la fibra y la materia orgánica (MO). Al respecto, Cerrato et al. (2005) concluyen que períodos prolongados (de 12 horas) a pH subóptimo afectan la fermentación ruminal y sugieren que los efectos negativos de un pH reducido dependen del tiempo total en que el mismo está por debajo del óptimo. Por lo tanto, dichos efectos no son abolidos cuando se distribuye en varios ciclos de tiempo diarios.

En la literatura pueden encontrarse diversas opiniones acerca de los valores de pH que generan un estado de acidosis ruminal en los animales, el cual conduciría, incluso, a la necrosis de las papilas ruminales, comprometiendo su capacidad absorbente. De Veth y Kolver (2001) realizaron una revisión de 20 estudios, con vacas lecheras, y compararon 81 tratamientos. En estos tratamientos el 70% de la dieta de los animales estaba constituido por pastura fresca de buena calidad. El rango de valores medios de pH ruminal obtenido fue de 5.6 a 6.7 e indicaron que, en esas condiciones y con un pH ruminal de 5.8 a 6.2, los animales no presentan un estado de acidosis ruminal subaguda. Según Owens et al. (1998), este estado surgiría con valores de pH ruminal inferiores a 5.6. Brossard et al. (2004) provocaron, en ovinos, un estado de acidosis ruminal agudo y mantenido ($\text{pH} < 5.0$), a través del suministro de una dieta con excesiva cantidad de CHS. Los mismos, sugirieron que los protozoarios presentes en el rumen jugarían un rol importante en la prevención del desarrollo de una acidosis. Ésto lo lograrían a través de un control directo o indirecto de la fermentación ruminal y de las poblaciones bacterianas, siendo los protozoarios los mayores predadores de las bacterias del rumen (Eugène et al., 2004). Aunque también es posible que existan otros mecanismos de control dentro del rumen.

No obstante, consumiendo dietas basadas en forrajes, los rumiantes mantienen su pH ruminal entre 6.2 y 6.8 (Church, 1993). Dicho rango de valores coincide con los registrados en ensayos realizados en nuestro país, trabajando con pasturas de buena calidad y niveles bajos de suplementación (Repetto et al., 2000). Aunque, también han sido documentados valores de pH inferiores a los recomendables (Cajarville et al., 2000). De Veth y Kolver (2001) trabajando con pasturas de alta digestibilidad, también documentaron valores bajos de pH (5.6). Por el contrario, cuando aumenta el contenido de fibra del forraje, aumenta la producción de compuestos buffer y también el pH del rumen (Beauchemin, 1991).

3.1.2. Nitrógeno Amoniacal (N-NH₃)

El N-NH₃ ruminal surge como producto final de la degradación de proteínas, a partir del catabolismo microbiano ruminal de aminoácidos (aa), péptidos y sustancias nitrogenadas no proteicas como la urea, obtenida a partir de la dieta o endógena (Russell y Hespell, 1981).

Tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, este compuesto ha demostrado ser el principal nutriente nitrogenado necesario para el crecimiento de los mo del rumen. La mayoría de las bacterias ruminales pueden utilizar N-NH₃ como fuente de nitrógeno (N) para su crecimiento (Russell, 1996). De esta manera los mo fibrolíticos, a diferencia de la flora amilolítica, son capaces de cubrir sus requerimientos de N, para la síntesis proteica, solamente con el N-NH₃ (Bryant, 1973).

Poca cantidad de N-NH₃ puede ser retenida en el rumen. Por lo cual, el N-NH₃ producido en exceso al requerido es absorbido, en gran parte, a través de las paredes del rumen y transportado, vía portal, al hígado. Este órgano tiene la capacidad de transformar al N-NH₃ en urea con un costo energético de poca importancia según algunos autores (Di Marco et al., 1998). Dicho proceso resulta muy útil para el animal ya que las bacterias ruminales son capaces de utilizar el N de la urea para sintetizar proteínas, que luego serán absorbidas en el intestino delgado (Tebot et al., 2002). Aproximadamente 20% del NH₃ absorbido se originaría de esa urea reciclada antes que del alimento degradado (Lapierre et al., 2005). Por lo tanto, la síntesis de urea en el hígado, a partir del NH₃ absorbido, y su reciclaje en el rumen podrían resultar, en determinadas situaciones de carencia de N, en una ventaja productiva.

No obstante, cuando los animales consumen dietas a base de pasturas de alta calidad, las pérdidas pre-duodenales de N pueden ser de hasta 30% del N ingerido. Dichas pérdidas ocurren como consecuencia de altas concentraciones ruminales de N-NH₃ que pueden ser generadas por una rápida y extensa degradación del N de la pastura y/o por una limitada capacidad del hígado para metabolizar el N-NH₃ (Beeber y Siddons, 1986). De esta manera, se limitaría la eficiencia global del proceso digestivo (Elizalde et al., 1996; Berzaghi et al, 1996).

A su vez, el pH puede modificar la proporción de N-NH₃ en el rumen, produciéndose un descenso en la concentración del mismo cuando el pH disminuye desde un valor de 7 a 5.8 (Shriver et al., 1986). Esta relación entre ambos parámetros (pH y concentración de N-NH₃) es mediada por la actividad de proteasas y desaminasas microbianas. *In vitro*, se ha observado un fuerte descenso en la actividad de ambas enzimas a un pH inferior a 6.0, reflejándose en menores concentraciones de N-NH₃ y bajos recuentos de colonias proteolíticas (Erfle et al., 1981). Por lo tanto, la menor actividad de dichas enzimas, debida a una gran disminución del pH, podría resultar en una disminución de la síntesis microbiana.

Por otra parte, la concentración de N-NH₃ en el rumen puede variar ampliamente dependiendo de la dieta, hora y frecuencia de alimentación, animal y otros factores. Joo et al. (2005) sugirieron que existe cierta influencia de la tasa de liberación de N-NH₃ sobre la síntesis de PM en rumen. Además, algunas variantes pueden causar una disminución en la eficiencia de utilización (captura) del N-NH₃, por parte de los mo, y eventualmente una pérdida de N. Ésto depende, principalmente, de la tasa de liberación, disponibilidad y balance de carbohidratos (CH) y de la disponibilidad de N (Heldt et al., 1999; Hristov et al., 2005). De esta manera, si es limitada la cantidad de energía (E) presente en el rumen, obtenida a partir de la fermentación de la MO, la degradación de las proteínas de la dieta a N-NH₃, por parte de los mo, y la captación de N-NH₃ por los mismos, serán también limitadas (Hristov et al., 1997).

Hristov et al. (2005), investigando el efecto de distintas fuentes de CH en la utilización del N-NH₃ ruminal en vacas lecheras, demostraron que la provisión de E fácilmente fermentable en rumen puede disminuir la concentración de N-NH₃ ruminal. Ésto se produciría a través de una mejoría en la captura del N-NH₃ destinado a la síntesis de PM, entre otras causas.

Por lo tanto, la disponibilidad de CH para la fermentación ruminal constituye un factor clave para lograr una mejoría en la eficiencia de utilización del N-NH₃ ruminal, y del N de la dieta, por los rumiantes.

Por otra parte, a pesar de que las bacterias ruminales son capaces de utilizar muy eficientemente al N-NH₃, existen diversas opiniones acerca del nivel de N-NH₃ necesario para un óptimo crecimiento microbiano en el rumen. Éste, en general, se produce dentro de un rango de 5-20 mg/dl de N-NH₃. Por encima de esos valores no se evidenciaría un aumento en la producción de N microbiano (N_{mo}). Satter y Slyter (1974) consideran como nivel adecuado 5 mg/dl, mientras que Mehrez et al. (1977) afirmaron que, para maximizar la desaparición de la MS, las concentraciones de N-NH₃ deben ser de 20 mg/dl. Aunque, también fueron documentados distintos valores intermedios, limitantes para el incremento de las tasas de fermentación ruminal.

Cuando los rumiantes consumen forrajes de buena calidad, las concentraciones de N-NH₃ ruminal, son variables, presentando niveles de 6 a 30 mg/dl (Nápoli y Santini, 1988; Khalili y Sairanen, 2000), pero generalmente superiores a los considerados como limitantes. Investigaciones de Abarca et al. (1999), realizadas con pasturas mezcladas de gramíneas y leguminosas, registraron concentraciones de N-NH₃ ruminal de 18.2 a

20.4 mg/dl y concluyeron que este tipo de pasturas mejoran la dieta de los animales en pastoreo y su ambiente ruminal.

Los trabajos realizados en nuestro país, con rumiantes pastoreando praderas implantadas de gramíneas y leguminosas, reflejan que las concentraciones ruminales de N-NH₃ son elevadas (20,1 mg/dl, en promedio) y, por lo tanto, no serían la limitante para el crecimiento microbiano (Repetto et al., 2001).

3.1.3. Ácidos Grasos Volátiles

Los AGV son productos finales de la fermentación ruminal de los alimentos, y principalmente de los CH. Estos productos de deshecho, derivados del metabolismo microbiano en un sistema de fermentación anaeróbica, luego de ser absorbidos, son los principales proveedores de E para los procesos metabólicos de los rumiantes (Voelker y Allen, 2003).

Como resultado de la fermentación de CH, los AGV generados son el acetato, propionato, butirato y valerato, entre otros (Van Soest, 1994). Dietas basadas en forrajes (generalmente ricas en celulosa, con un contenido intermedio en CHS y pobres en almidón) resultan en una elevada producción de acetato, además de proporcionar entre 50 y 80 % de la E metabolizable utilizada por los rumiantes (Church, 1993).

No obstante, de los AGV presentes en el rumen, no todos derivan directamente de la fermentación de los CH, también pueden resultar de la acción microbiana sobre proteínas u otros compuestos nitrogenados (Maynard et al., 1981). Algunos de los aa que pueden ser transformados en AGV son: la valina, que se transforma en ácido iso-butírico, leucina en ácido iso-valérico, y prolina y otros esqueletos carbonados en ácido valérico (Nápoli y Santini, 1987).

Es ampliamente conocido el rol que cumplen estos ácidos en la reducción del pH ruminal, siendo éste mínimo entre ½ y 4 hs luego de la ingesta (Church, 1993). Por lo tanto, la producción de AGV en el rumen está íntimamente relacionada con el pH ruminal. Éste, además de ser un importante regulador para la producción y crecimiento microbiano (Russell y Dombrowski, 1980), es capaz de afectar la producción de los productos finales de la digestión. Como resultado de una gran producción de AGV se observa una rápida absorción de los mismos, en su forma no disociada y desde el rumen, dirigida a su reducción y a la estabilización del pH ruminal (Sniffen y Thomas, 1991; Dijkstra et al., 1993). El pKa para cada AGV es diferente, el del ácido acético, por ejemplo, es de 4.76 y para la mayoría de los AGV es de aproximadamente 4.8. Por lo tanto, una caída del pH ruminal hacia dichos valores lleva al incremento de cada AGV en su forma no disociada y de sus tasas de absorción (Kohn y Dunlap, 1998). Aunque un bajo pH ruminal podría disminuir la motilidad ruminal, resultando en una menor capacidad ruminal de mezcla de su contenido y, por consiguiente, en una tasa de absorción más lenta (Voelker y Allen, 2003; Kristensen y Harmon, 2004).

A pesar de las grandes oscilaciones en la población microbiana y de las diferencias en el consumo de alimentos, las proporciones de los AGV en el rumen, se mantienen notablemente estables. Sus proporciones molares son generalmente próximas a 65: 25: 10, para el acetato, propionato y butirato, respectivamente, con dietas a base de forrajes (Church, 1993). Ésto sin considerar otros AGV de menor importancia, como ser el valérico, el isovalérico y el isobutírico (Jarrige, 1990). Estos productos son continuamente absorbidos desde el rumen, luego de su producción, con una tasa de absorción, en orden, de isobutirato < acetato = propionato = butirato < valerato (Kristensen et al., 2000). Por lo tanto, las tasas de absorción fraccionales de acetato, propionato y butirato, son similares, pero a un pH ruminal próximo a 6.3 (Sniffen y Thomas, 1991; Dijkstra et al., 1993).

Ha sido asumido que el epitelio ruminal también tiene la capacidad de utilizar a los AGV en distintas proporciones, a medida que son absorbidos (Maynard et al., 1981; Kristensen, 2005). Proporcionalmente 0.3, 0.5 y 0.7 del acetato, propionato y butirato absorbidos desde el rumen, respectivamente, son metabolizados por su epitelio (Bergman y Wolff, 1971) y numerosos estudios lo han verificado. Aunque, observaciones *in vitro* recientes muestran que, menor cantidad de AGV es metabolizada y oxidada en el epitelio ruminal (Kristensen, 2005).

Para estimar las tasas de producción de los AGV en el rumen han sido desarrollados varios métodos. Aunque su alto costo y falta de exactitud (Corley y Murphy, 2004) además de la complejidad de las interacciones y competitividad en la activación, absorción y metabolismo de los distintos AGV, llevan a que la estimación de su producción resulte dificultosa (Kristensen, 2005).

3.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA EN RUMEN

Existen muchos métodos para estimar la producción de PM que entrará al duodeno. Entre ellos se encuentra la determinación de bases púricas (BP), utilizadas como marcador microbiano. Su principio se basa en que los ácidos nucleicos, sintetizados por los mo ruminales, son degradados por enzimas a BP y pirimidínicas. Las mismas son eficientemente absorbidas en el intestino delgado, degradadas por enzimas, y la mayoría de sus metabolitos son excretados en la orina. Éstos son: alantoína, en mayor proporción (86% según Puchala y Kulasek, 1992), pero también xantina, hipoxantina y ácido úrico (Martín-Orúe et al., 1996; Tebot et al., 2002). Muchos autores han revelado una cercana relación entre los ácidos nucleicos que alcanzan el intestino delgado del animal y la excreción urinaria de derivados purícos, especialmente alantoína (Tebot et al., 2002; Yáñez et al., 2004). Siendo, la estimación de alantoína, más precisa que la de todos los derivados purícos excretados en la orina (Puchala y Kulasek, 1992). Además, este método puede ser aplicado en animales intactos, requiriendo solamente de la recolección de orina (Martín-Orúe et al., 1996).

Con dietas a base de forrajes, la producción de N mo en el rumen puede ser la principal fuente de proteína que llega al intestino delgado del rumiante (Pérez et al., 1997),

pudiendo representar más del 50% del suministro de proteína duodenal (Lapierre et al., 2005). En el mismo sentido, Gosselink et al. (2003) en una revisión bibliográfica constataron que la cantidad de PM sintetizada representa, en promedio, 64% del flujo de proteína entrante al duodeno, en rumiantes consumiendo forrajes.

Por lo tanto, la mitad de los aa absorbidos en el intestino delgado de los rumiantes, y a menudo 2/3 a 3/4 partes, derivan de la PM (AFRC, 1992). Los mo del rumen tienen un perfil de aa variable, pero generalmente bueno (Dewhurst et al., 2000), y muy cercano al requerido por los rumiantes (O'Connor et al., 1993). Por lo tanto, la PM debe ser considerada como la principal fuente proteica para el animal, en condiciones normales de alimentación. Dietas con alta proporción de forraje, resultan benéficas para la producción de PM (Yang y Beauchemin, 2004). La eficiencia de este proceso es expresada, generalmente, como la cantidad de N mo producido por kg de MO aparentemente digerida en rumen (MODR). El ARC (1984) adoptó un valor promedio de 30 g N /kg MODR, aunque existe un amplio rango de valores en la bibliografía.

Los principales factores que influyen en la producción microbiana ruminal son: el nivel proteico de la dieta, cantidad y disponibilidad de N (Hristov et al., 1997; Gosselink et al., 2003); nivel de ingesta (Heldt et al., 1999); y, fundamentalmente, la cantidad, disponibilidad, tipo y balance de CH (Dewhurst et al., 2000; Gosselink et al., 2003). Siendo necesaria una correcta sincronización entre el aporte de materias nitrogenadas (MN) y CHS al rumen para favorecer el crecimiento microbiano, e incrementar el flujo de PM al duodeno (Branine y Galyean, 1990; Berzaghi et al., 1996).

Como se mencionó anteriormente, las concentraciones de N-NH₃ ruminal no representan, en nuestro país, una limitante para el crecimiento microbiano, a diferencia de la E. Ésta es obtenida principalmente a partir de la fermentación de los CHS contenidos en el forraje fresco (Dove y Milne, 1994). Por lo tanto, si la dieta no aporta las cantidades necesarias de CHS, utilizados como fuente energética para la síntesis microbiana en rumen, la utilización total de ese N-NH₃ producido no es posible. De manera que existe un desbalance entre N y E y una baja eficiencia de síntesis de PM.

Muchos estudios, dirigidos a sincronizar la degradación ruminal de N y E, han generado resultados conflictivos. Los mismos han utilizado diferentes principios, como ser la combinación de ingredientes en las distintas dietas utilizadas. También, alterando los horarios relativos de alimentación; dosificando fuentes específicas de E y N al rumen; o por combinación de estos métodos (Dewhurst et al., 2000).

Algunos estudios, *in vitro* (Henning et al., 1993) e *in vivo* (Richardson et al., 2003) no han mostrado mejoría en la síntesis de PM debido a la sincronía de N-E en rumen. Mientras que otros estudios, *in vivo*, como el de Herrera-Saldana et al. (1990), Kolver et al. (1998) y Miller et al. (1999), sugieren una respuesta positiva lograda con la mejor sincronización. Aunque, para algunos, esos cambios fueron muy transitorios (de 2 a 4 horas de duración) y tuvieron poco impacto en la síntesis diaria de PM (Kolver et al., 1998).

3.3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE FORRAJES TEMPLADOS

Las praderas templadas de nuestro país proveen a los mo ruminales un sustrato de rápida fermentabilidad y alto contenido de proteína bruta (PB) de rápida degradación ruminal (Repetto et al., 2005), pero con niveles variables de CHS. Éstos últimos tienden a ser bajos, lo que limitaría la eficiencia de utilización del N por los mo del rumen (Khalili y Sairanen, 2000; Trevaskis et al., 2001).

Los CH de las plantas forrajeras constituyen entre el 50 a 80 % de la materia seca (MS) y pueden ser clasificados en tres categorías, desde un punto de vista fisiológico: a- polisacáridos estructurales, principalmente pectinas, celulosa y hemicelulosas; b- azúcares simples, que actúan en el metabolismo intermediario, y c- componentes de reserva temporaria como fructanos y sucrosa (Van Soest, 1994). La luz es la principal fuente de E para la planta y son los CH la principal reserva de E fotosintética.

Se han registrado incrementos en el contenido de azúcares solubles de las plantas cuando existe alta intensidad de luz, y por lo tanto de actividad fotosintética, al tiempo que los componentes de la pared celular disminuyen (Sniffen y Thomas, 1991; Mayland et al., 2005), probablemente por dilución (Van Soest, 1994; Mayland et al., 2005). La fijación de carbono por parte de las plantas está limitada al período diurno, con un consumo constante. Por esta razón una reserva temporaria es indispensable. Ello se efectúa en forma de almidón dentro de los cloroplastos y de sacarosa dentro de las vacuolas que son movilizadas durante la noche. Por lo tanto, el tenor de sacarosa aumenta en el curso del día llegando a un máximo al atardecer y disminuyendo, luego, hasta el comienzo del nuevo día (Mayland et al., 2005).

Con respecto a la variación de la concentración de azúcares en los forrajes, los CH no estructurales (CHNE) totales, han resultado superiores durante la tarde, comparado con la mañana, (Griggs et al., 2005). De la misma manera, Repetto et al. (2003a), durante el otoño y en nuestro país, muestreando parcelas de especies puras de gramíneas y leguminosas, en diferentes cortes y en 3 momentos del día (mañana, mediodía y tarde), registraron importantes incrementos en los contenidos de CHS en el correr del día. En promedio, dichos incrementos fueron próximos a un 75% para alfalfa y un 110% para festuca. Los mismos autores observaron también, que la relación de CHS/MN de las plantas aumentaron en la tarde, en comparación con la mañana, ya que el contenido de MN tiende a mantenerse constante (Repetto et al., 2003b).

4. HIPOTESIS

Las variaciones en la composición química de la pastura a lo largo del día, con mayores niveles de azúcares solubles durante la tarde, provocarían cambios en el ambiente ruminal y en la síntesis de proteína microbiana de los animales que la consumen.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el momento del día en que se corta una pastura tiene repercusión en el ambiente ruminal y en la producción de proteína microbiana de ovinos que la consumen.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

-Analizar la composición química, el contenido de azúcares solubles, nitrógeno, y la relación entre ambos, en la pastura ofrecida y en distintos momentos del día.

-Evaluar si el momento del día en el que los animales consumen un forraje fresco, afecta la dinámica del pH y las concentraciones de nitrógeno amoniacal y ácidos grasos volátiles a nivel ruminal.

-Determinar si el momento del día en el que los animales consumen un forraje fresco, tiene efecto sobre la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental fue realizado en el Campo Experimental N° 2 (Libertad) y en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria.

6.1 ANIMALES, DIETAS Y TRATAMIENTOS

Para la realización del diseño experimental se utilizaron 5 corderos Corriedale x Milkschaf (25 ± 0.86 kg P.V) canulados en rumen. Éstos fueron alojados en jaulas metabólicas individuales, con libre acceso al agua, durante todo el diseño experimental. La dieta administrada a los animales consistió en una pradera templada implantada, en estado vegetativo. La misma estaba compuesta por una mezcla de gramíneas (90%), principalmente raigrás (*Lolium multiflorum*) y Avena (*Avena sativa*), con predominio de ésta última, y leguminosas (10%), trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol blanco

(*Trifolium repens*), lotus (*Lotus corniculatus*). Su composición al inicio del experimento se describe en la Tabla I.

Tabla I. Composición química de la pastura consumida por los animales al inicio del diseño experimental

Disponibilidad, kgMS/há	MS, %	MO, %*	FND, %*	FAD, %*	PB, %*
4400	14.7	88.7	49.9	26.8	14.4

*: datos expresados en base seca.

La pastura fue suministrada, como único alimento, inmediatamente luego de ser cortada en dos momentos del día y asignadas a dos tratamientos diferentes:

- Tratamiento M: Forraje cortado en la mañana (7:00 h).
- Tratamiento T: Forraje cortado en la tarde (18:00 h).

El forraje fue ofrecido a los animales durante un horario restringido de 4 horas (de 7:00 a 11:00 h y de 18:00 a 22:00 h, M y T respectivamente).

Las pruebas se realizaron en períodos experimentales de una semana de duración, luego de una adaptación de aproximadamente 10 días (total 17 días). En el período I dos de los animales fueron sometidos al tratamiento M y otros 2 al tratamiento T. En el período II se invirtieron los tratamientos, constituyendo un diseño cruzado. En el período III, se utilizó un cordero extra que fue sometido al tratamiento T. Este período, y animal, fueron incorporados al diseño experimental a partir del período II inclusive, como consecuencia del descarte de 1 de los animales. De esta manera se logró que 4 corderos fueran sometidos a los 2 tratamientos, en períodos de tiempo diferentes.

Durante el diseño experimental, muestras de la pastura consumida y materias fecales eliminadas por los animales fueron analizadas. De esta manera, se analizó la composición química de la pastura, el consumo individual y la digestibilidad aparente. Además, finalizado cada período experimental, se procedió a la extracción de muestras de líquido ruminal para su posterior determinación del pH. Submuestras de cada extracción fueron almacenadas para analizar las concentraciones de N-NH₃ y AGV. El volumen de orina, eliminada por los animales fue determinado durante cada período experimental, almacenando muestras para la determinación de alantoína urinaria.

6.2. MEDICIONES Y CÁLCULOS REALIZADOS

6.2.1. Composición química de la pastura y heces

La composición química de la pastura (ofertas y rechazos) y de las heces fueron analizadas para MS (por el secado de las muestras, a 105°C, hasta lograr un peso constante) y para MO. Además, se determinó el contenido de PB de la pastura. Tanto la MO como la PB fueron analizadas según A.O.A.C (1984). Las determinaciones de fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) se realizaron de acuerdo con la técnica descrita por Goering y Van Soest (1970). Finalmente, el contenido de CHS de la pastura se analizó siguiendo la técnica descrita por Yemm y Willis (1954). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5 % según el parámetro.

6.2.2. Consumo

El consumo de cada animal fue determinado por diferencia entre la MS ofrecida y la rechazada. El mismo fue expresado como MS ingerida (kg/día), obtenida a partir de: MS ofrecida (kg) – MS rechazada (kg), y como MO ingerida (kg/día), obtenida a partir de: MO ofrecida (kg) – MO rechazada (kg). A partir de estos datos se calculó el consumo individual expresado en g de MS y MO ingeridos por kg de peso metabólico ($\text{kg}^{0.75}$).

6.2.3. Materia Orgánica Digestible ingerida (MODI)

Se extrajeron muestras de materia fecal y se congelaron alícuotas de las mismas, equivalentes al 10% del total de heces emitidas por cada animal y por día. A partir éstas se determinó la MODI como: coeficiente de digestibilidad de la MO x MO ingerida (kg). La MODR fue asumida como el 65% de la MODI.

6.2.4. Ambiente Ruminal

Muestras de líquido ruminal de cada animal, tratamiento y hora, durante 24 horas, fueron extraídas mediante una sonda permanente colocada en el rumen de los corderos. A partir de las mismas se estudiaron la evolución diurna del pH y las concentraciones de N-NH₃ y AGV.

6.2.4.1. pH

El pH fue determinado en forma inmediata a la extracción de cada muestra utilizando un pHmetro digital.

6.2.4.2. Nitrógeno Amoniacal

Una alícuota (10 ml) de cada extracción de líquido ruminal fue congelada, utilizando cloruro de sodio al 20% (10 ml) como conservante. La concentración de N-NH₃ ruminal fue determinada por destilación directa, con tetraborato de sodio.

6.2.4.3. Ácidos Grasos Volátiles

Las concentraciones de AGV totales (AGVt) e individuales (acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico y caproico) fueron determinadas, también a partir de una alícuota de cada extracción de líquido ruminal congelada, con ácido metafosfórico al 20% como conservante. Estos análisis fueron realizados, por cromatografía de gases, en el INTA Castelar (Argentina).

6.2.5. Alantoína y Producción de Proteína Microbiana

Se colectó el total de orina eliminada por los animales, durante 5 días de cada período experimental, para la determinación de la eliminación de alantoína. La misma fue determinada para cada animal, a partir de alícuotas de orina (de 30 ml) colectadas diariamente y congeladas, con ácido sulfúrico al 10% como conservante. Para su determinación se empleó el método de Fujihara et al. (1987) y la producción de PM fue estimada a partir de la alantoína eliminada por la orina, de acuerdo a la fórmula propuesta por Puchala y Kulasek (1992):

$$y = e^{(0.830 + 2.089x)}$$

donde "y" representa el N mo (g/d) que llega al duodeno y "x" la excreción urinaria de N de alantoína (g/d). Además, la eficiencia de producción de PM en el rumen, fue expresada como: g de N mo por kg de MS digerida, g de N mo por kg de MO digerida y como g de N mo por kg de MODR. Considerando a la MS digerida (kg) como: MS ingerida (kg) – MS heces (kg) y, a la MO digerida (kg) como: MO ingerida (kg) – MO heces (kg).

6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los parámetros de fermentación ruminal fueron analizados estadísticamente como medidas repetidas, usando un modelo mixto (proc. mixed del SAS), incluyendo los efectos animal, período, tratamiento, hora y la interacción tratamiento x hora. Mientras que el contenido diario de CHS y N de la pastura, y la relación entre ambos fueron comparados, entre tratamientos para los distintos días de medición, utilizando el modelo general lineal (GLM), considerando los 3 períodos experimentales, como bloques. Los niveles de consumo, los de digestibilidad aparente, y la producción de PM, fueron comparados, para ambos tratamientos, también utilizando el modelo GLM. En este caso se incluyeron los efectos período, tratamiento y animal.

7. RESULTADOS

7.1. EVOLUCIÓN DIURNA DE LOS AZÚCARES SOLUBLES DE LA PASTURA OFRECIDA

Los porcentajes de CHS y N, así como la relación entre ambos componentes de la pastura, se representan en la Tabla II. En la misma se puede apreciar un mayor contenido de CHS, en la pastura ofrecida a los animales, durante la tarde. Al mismo tiempo se produjo la disminución porcentual del contenido nitrogenado de la pastura, generando una relación CHS/N ascendente a lo largo del día.

Tabla II. Contenido de azúcares solubles (CHS), nitrógeno (N) y su relación, según el horario de corte de la pastura consumida por los animales (M o T) y el período experimental (I, II o III). Datos expresados en base seca (n=14; M: 6, T:8).

	Período Experimental						M vs T	
	I		II		III	ESM	P	
	M	T	M	T	T			
CHS, %	7.99	10.6	20.3	22.9	16.0	0.312	0.003	
N, %	1.72	1.61	1.20	1.16	0.97	0.030	ns	
CHS/N	4.69	6.60	16.9	19.9	16.7	0.294	0.003	

M: forraje cortado y ofrecido en la mañana, T: forraje cortado y ofrecido en la tarde, ESM: error estándar de las medias, P: probabilidad estadística, ns: no significativo ($P > 0.05$)

7.2. CONSUMO Y DIGESTIBILIDAD APARENTE

Las cantidades de MS y MO que fueron ingeridas por los animales, así como también la MODI y la cantidad de MODR, fueron similares para ambos tratamientos (Tabla III).

Tabla III. Ingesta y digestión de MS y MO en corderos alimentados con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T)

	M	T	ESM	P
Ingesta, kg/d				
MS	0.552	0.500	0.031	ns
MO	0.501	0.458	0.028	ns
Ingesta, g/kg ^{0.75}				
MS	49.3	44.6	2.7	ns
MO	44.7	40.9	2.5	ns
MODI, kg	0.412	0.368	0.018	ns
MODR, kg	0.269	0.241	0.011	ns

kg/d: kilogramos por día, g/kg^{0.75}: g ingeridos por kg de peso metabólico, MODI: materia orgánica digerible ingerida, MODR: materia orgánica aparentemente digerida en rumen. ESM: error estándar de las medias, P: probabilidad estadística, ns: no significativo (P>0.05).

7.3. AMBIENTE RUMINAL

7.3.1 pH

La evolución diurna del pH ruminal de los corderos se representa en la Figura 1. En la misma puede observarse la disminución del pH producida inmediatamente luego de la ingesta (hora 0). Esta disminución persiste por aproximadamente 4 horas.

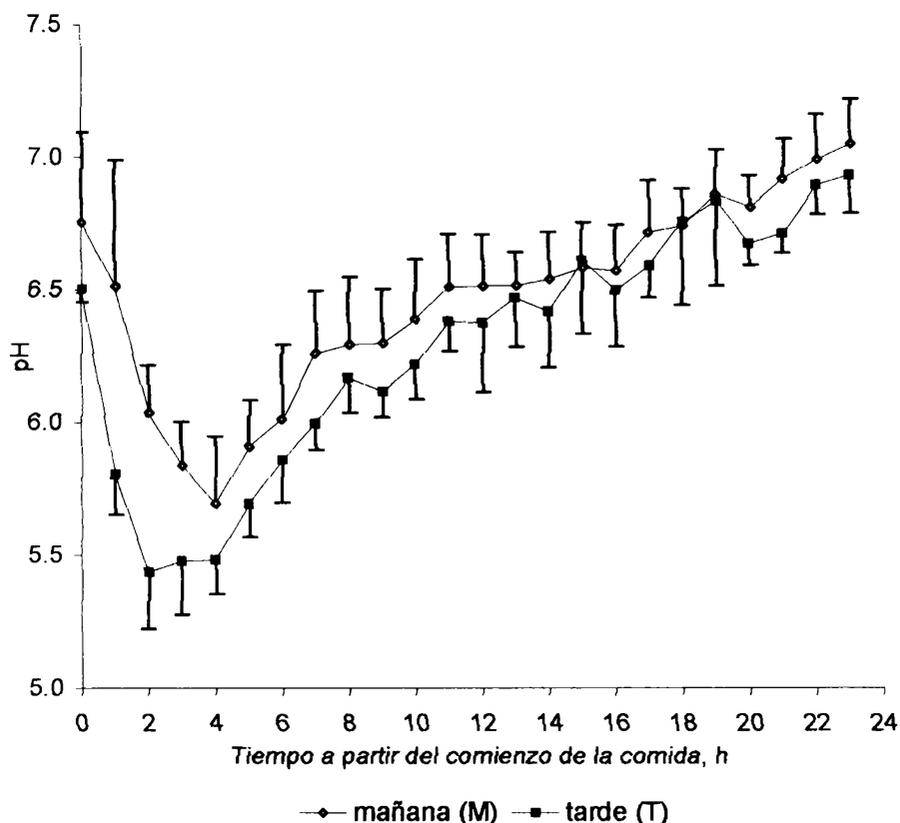


Figura 1. pH ruminal en corderos alimentados de mañana o de tarde. Medias \pm error estándar (ES).

En cuanto a los valores medios de pH obtenidos en este trabajo (Tabla IV) se halló una diferencia importante entre tratamientos ($P = 0.001$). Aunque, tal como se observa en la figura 1 y en la Tabla IV, la forma de las curvas de pH fueron muy similares para ambos tratamientos, dado que la interacción $t \times h$ no fue significativa.

Por otra parte, se constataron diferencias significativas entre las distintas horas de cada tratamiento (Tabla IV). Principalmente desde las horas 2 a 7 (M) y 1 a 7 (T), en relación al comienzo de la comida.

Los valores mínimos de pH registrados fueron inferiores para T ($P < 0.001$), con valores de 5.69 y 5.44, 4 y 2 horas luego del comienzo de la ingesta (M y T respectivamente). Registrándose períodos de 5 y 9 horas (M y T, respectivamente) en los cuales el pH ruminal presentó valores inferiores al óptimo necesario para las bacterias ruminales.

Tabla IV. Valores medios de pH ruminal y concentración de N-NH₃ en el líquido ruminal de corderos alimentados con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T)

	M	T	ES	P		
				t	h	txh
pH	6.47	6.28	0.057	0.001	<0.001	ns
N-NH ₃ , mg/dl	17.78	18.53	1.405	ns	0.002	ns

ES: error estándar, t: efecto tratamiento, h: efecto hora, txh: interacción entre tratamiento y hora, ns: no significativo ($P > 0.05$).

7.3.2. Nitrógeno Amoniacal

Con respecto a la concentración de N-NH₃ en el líquido ruminal de los animales (Figura 2) se constató un incremento producido a partir del comienzo de la ingesta (hora 0). El mismo se registró hasta alcanzar valores máximos a la hora 4, para ambos tratamientos (32.57 y 29.24 mg/dl, M y T respectivamente).

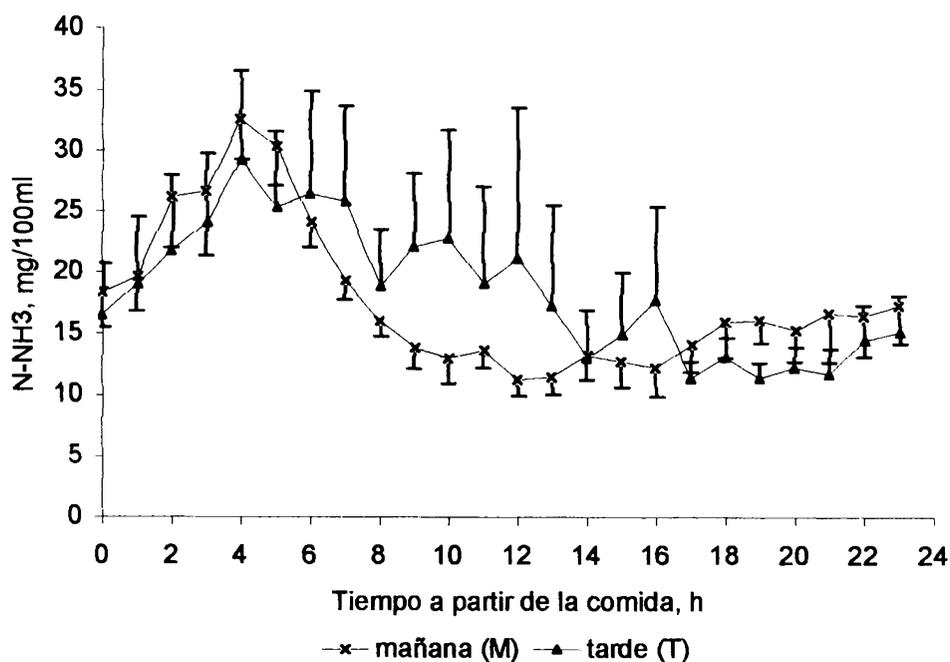


Figura 2. Concentración de N-NH₃ en el líquido ruminal de corderos alimentados de mañana o de tarde (Medias ± ES).

Tal como puede observarse en la Tabla IV, no fueron halladas diferencias significativas, entre tratamientos, para este parámetro. Además, como se observa en la Tabla IV y en la Figura 2, la forma de las curvas de N-NH₃ para ambos tratamientos fueron similares, ya que la interacción t x h no fue significativa.

No obstante, existieron diferencias importantes entre las distintas horas de muestreo, para ambos tratamientos (Tabla IV).

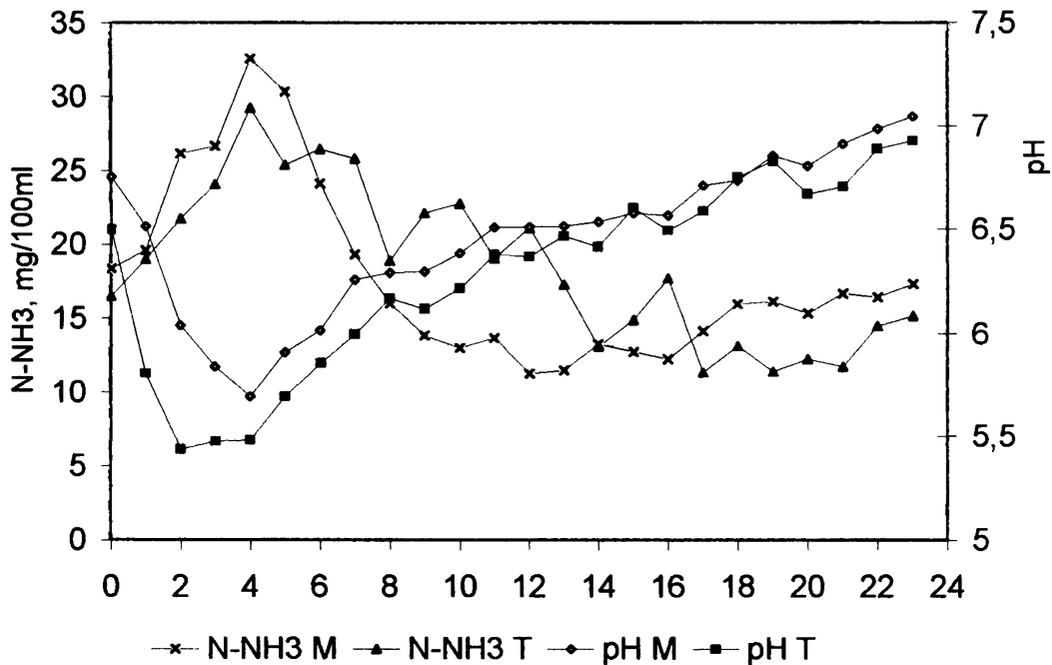


Figura 3. pH y concentración de N-NH₃ en el fluido ruminal de corderos alimentados durante la mañana (M) o la tarde (T).

Como se puede apreciar en la Figura 3, las curvas se presentan en forma de espejo. De manera que los momentos en que la concentración de N-NH₃ fue máxima coinciden con los de mínimo pH y para ambos tratamientos.

7.3.3. Ácidos Grasos Volátiles

Con respecto a los AGVt (Figura 4) se registró un aumento de su concentración a partir del comienzo de la ingesta, hasta alcanzar un máximo nivel alrededor de la hora 4, para ambos tratamientos (130.5 y 119.8 mM, M y T respectivamente).

Las concentraciones medias de AGVt, registradas para ambos tratamientos, se representan en la Tabla V.

Tabla V. Concentración de AGVt e individuales en el fluido ruminal de corderos alimentados con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T)

	M	T	ES	P		
				t	h	txh
AGVt, mM	92.53	95.42	4.043	ns	<0.001	ns
Acetato (A)	54.67 ^a	53.92 ^a	2.636	ns	<0.001	ns
	60.23 ^b	57.13 ^b	1.517	0.046	0.020	ns
Propionato (P)	25.93	25.82	1.757	ns	<0.001	ns
	27.05	26.69	1.228	ns	0.009	ns
Butirato	8.757	11.88	0.872	<0.001	<0.001	ns
	9.004	11.93	0.622	<0.001	0.001	ns
Isobutirato	0.886	0.597	0.218	ns	0.002	ns
	1.252	0.857	0.290	ns	<0.001	ns
Valerato	1.129	2.164	0.335	0.003	0.036	ns
	1.102	2.115	0.305	0.002	ns	ns
Isovalerato	1.103	0.909	0.171	ns	ns	ns
	1.281	1.086	0.206	ns	0.008	ns
Caproato	0.008	0.090	0.020	<0.001	0.041	ns
	0.008	0.087	0.018	<0.001	0.030	0.043
A:P	2.339	2.361	0.182	ns	0.008	ns

a: concentraciones absolutas (mM); b: proporciones molares (%)

ES: error estándar, t: efecto tratamiento, h: efecto hora, txh: interacción entre tratamiento y hora, ns: no significativo (P > 0.05).

En la misma se observa que para los AGVt no fueron halladas diferencias significativas entre tratamientos, ni en la interacción t x h, resultando en curvas similares para ambos tratamientos (Figura 4 y Tabla V). Aunque, sí existieron diferencias significativas entre las distintas horas de cada tratamiento (P < 0.001).

Las concentraciones de cada AGV presente en el líquido ruminal pueden observarse en la tabla V. Entre ellos, el ácido acético resultó ser el más abundante para ambos tratamientos, seguido por los ácidos propiónico y butírico. Mientras que, para el resto

de los AGV analizados (isobutírico, valérico, isovalérico y caproico) fueron registradas pequeñas cantidades, en comparación con los otros AGV.

Con respecto a las diferencias halladas entre tratamientos (M y T), los ácidos butírico, valérico y caproico, expresados tanto en concentraciones absolutas como en sus proporciones molares, presentaron mayores valores para T. Además, el ácido acético, expresado en proporción molar, fue significativamente menor para T (Tabla V).

Se evaluó, también, la relación acético:propiónico (Tabla V), registrándose valores similares para ambos tratamientos.

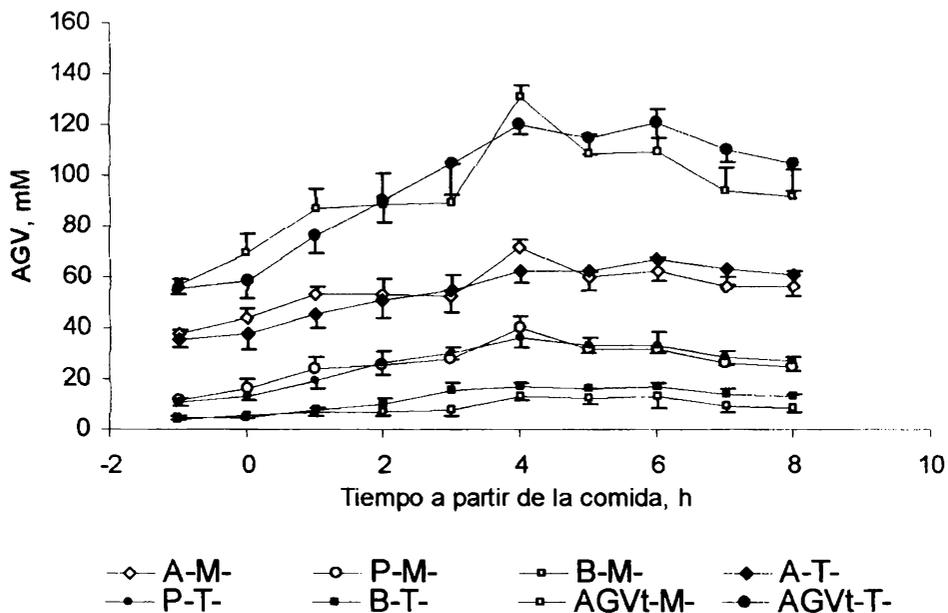


Figura 4. Concentración de AGVt e individuales (Acético: A, Propiónico: P, Butírico: B) en el líquido ruminal de corderos alimentados de mañana (-M-) o de tarde (-T-). (Medias \pm ES)

En la Figura 4 se representan, además de las concentraciones de AGVt, las concentraciones de los diferentes AGV presentes en mayor proporción en el líquido ruminal. En la misma se puede observar cómo para cada uno de ellos se registraron valores máximos 4 horas luego del comienzo de la ingesta.

Cuando las concentraciones obtenidas de AGVt (Figura 5) fueron enfrentadas a los niveles de pH ruminal registrados, puede observarse el incremento de los AGVt producido en forma casi simultánea con la disminución del pH ruminal y viceversa,

para ambos tratamientos. De esta forma, la mayor concentración de AGVt, registrada alrededor de la hora 4, coincide con los mínimos valores de pH obtenidos.

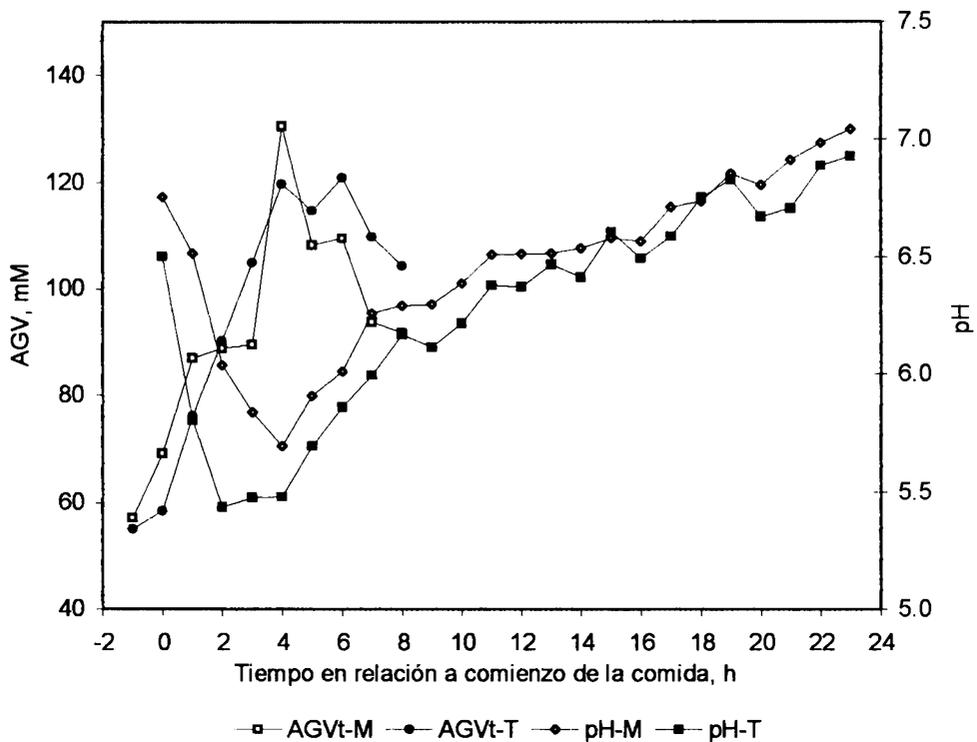


Figura 5. Evolución diurna del pH y concentración de AGVt en corderos alimentados durante la mañana (-M) o la tarde (-T).

7.4. ALANTOÍNA Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA

La eliminación diaria de alantoína, el N mo y la eficiencia de síntesis microbiana se presentan en la Tabla VI. En la misma puede observarse que las diferencias halladas entre ambos tratamientos no resultaron significativas para ninguno de los parámetros determinados.

Tabla VI. Excreción urinaria de alantoína, N mo y eficiencia de síntesis microbiana, en corderos alimentados con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T)

	M	T	ESM	P
Excreción urinaria:				
Alantoína (g/d)	0.930	0.750	0.012	ns
N mo (g/d)	4.710	4.160	0.052	ns
N mo (g/kgMSing.)	8.640	9.390	1.433	ns
N mo (g/kgMOing.)	9.550	10.18	1.552	ns
Eficiencia de síntesis microbiana:				
g N mo/kgMSdig.	10.77	13.60	3.092	ns
g N mo/kgMOdig.	11.60	14.53	2.302	ns
g N mo/kgMODR	18.12	20.59	1.820	ns

*ESM: error estándar de las medias, P: efecto tratamiento, ns: no significativo (P>0.05).
ing.: ingerida, dig.: digerida; g/d: gramos por día.*

8. DISCUSION

8.1. pH RUMINAL

Los valores promedio de pH ruminal obtenidos en el presente trabajo se encuentran dentro del rango normal esperado (de 6.2-6.8) para rumiantes consumiendo dietas basadas en forrajes. Dichos valores coinciden con los obtenidos en diferentes trabajos con rumiantes a pastoreo (Abarca et al., 1999; Cajarville et al., 2000).

En este caso, alimentando a los animales en forma restringida, solamente una vez por día y durante 4 horas, la variación del pH producida durante el día fue importante. De esta manera, se registró una notoria disminución del pH a partir del comienzo de la ingesta y dentro de las primeras 4 horas post-ingestión. Sin embargo, cuando el régimen de alimentación es continuo las fluctuaciones del pH ruminal durante el día son débiles o poco notorias (Pérez et al., 1997). Muchos autores han relacionado la disminución del pH ruminal, producida a partir de la ingesta, con el aumento de las concentraciones de AGV en el rumen (Marshall et al., 1992, Voelker y Allen, 2003). Estos autores propondrían a los AGV como los

posibles responsables de la disminución del pH producida a partir de la ingesta en este experimento.

Los valores inferiores de pH ruminal obtenidos cuando los animales fueron alimentados durante T se deberían, probablemente, al mayor contenido de CHS en la pastura y quizás a una mayor producción de AGV a partir de la misma.

La administración de CH almidonosos, a través de la suplementación con granos (García et al., 2000), o tras la inyección intraruminal de almidón en vacas lecheras a pastoreo (Rémond et al., 2002), se ha relacionado con rápidas disminuciones en el pH ruminal. Con respecto a los CHS, si bien la información es escasa, en nuestro país, pasturas cortadas a diferentes horas del día muestran que las concentraciones ascendentes de CHS registradas a lo largo del día, se corresponden con el incremento en la fermentabilidad de las mismas (Repetto et al., 2006).

En este trabajo, las diferencias de pH halladas entre ambos tratamientos no se correspondieron con diferencias significativas en las concentraciones de AGVt. Lo mismo fue hallado por Rabelo et al. (2003) quienes, utilizando 2 dietas con distinta densidad energética en vacas lecheras, con la de mayor densidad energética registraron un pH ruminal más bajo, sin observar, tampoco, grandes cambios en las concentraciones de AGV. No obstante, en este caso, no podemos saber si las diferencias de pH, halladas entre M y T, fueron o no causadas por los AGV producidos a partir del forraje administrado. Esto se debería a que no se midió la producción sino concentraciones instantáneas de AGV en el rumen.

Aunque en este estudio el lactato no fue medido, su producción y concentración en rumen pudieron haber aumentado durante T, con la consiguiente disminución del pH. Ésto se produciría como consecuencia del mayor contenido de CHS en la pastura, durante la tarde. Al respecto, Heldt et al. (1999) constataron un mayor potencial para la producción de lactato con CHS que con almidones.

Por otra parte, los bajos valores de pH registrados en este trabajo a 4 y 2 horas luego del comienzo de la comida, para M y T respectivamente, se corresponden con aquellos que causarían disminución de la actividad celulolítica y de las reacciones de desaminación, e incluso con los que generarían un estado de acidosis en los animales, según algunos autores (Owens et al., 1998; Brossard et al., 2004). A pesar de que los bajos valores de pH registrados durante el día fueron transitorios, tardaron 4 y 9 horas (M y T, respectivamente) en recuperarse. Esto podría indicar que la degradación de la fibra fue afectada.

8.2. NITRÓGENO AMONIACAL RUMINAL

En este trabajo, los niveles de N-NH₃ en el líquido ruminal, probablemente no resultaron ser una limitante para la síntesis de PM. Esto se debería a que, para

ambos tratamientos y todos los períodos experimentales, su concentración superó los niveles considerados como limitantes para la misma (5-20 mg/dl).

A pesar de que se hubiera esperado que una mayor provisión de E fácilmente fermentable al rumen, lograda durante T, generase una menor concentración de N-NH₃ ruminal, debido a un mejor aprovechamiento del N por los mo, ésto no se observó en este ensayo.

La concentración de N-NH₃ en el rumen puede disminuir como consecuencia de una mayor utilización del mismo para la síntesis de PM, ya sea debido a una alta disponibilidad de E, o a una menor producción amoniacal (Oba y Allen, 2003; Hristov et al., 2005). Esto se demostró en estudios *in vitro*, cuando se adicionó CH a las incubaciones, detectándose la disminución de la concentración de N-NH₃ (Hristov et al., 1997; Lee et al., 2003). El mismo resultado se obtuvo, *in vivo*, adicionando en rumen glucosa y almidón (Osborne et al., 2002; Oba y Allen, 2003), sucrosa y xilosa (Khalili y Huhtanen, 1991) o tras la inyección intraruminal de mezclas de CH (Hristov et al., 2005).

Sin embargo, al igual que en este trabajo, la adición de azúcares en algunos casos no generó una disminución en la concentración de N-NH₃ en rumen (Sannes et al., 2002; Kim et al., 2005).

8.3. ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES

En relación a los AGVt, en este trabajo, su concentración fue similar para ambos tratamientos. Según otros autores, la adición de CHS en la dieta de los animales, generalmente ha resultado en un incremento de la concentración de AGV en el rumen (Nocek, 1997), así como también tras la inyección de almidón intraruminal (Rémond et al., 2002). Aunque, los efectos de la adición de CHS en la concentración de AGV en rumen, y sus perfiles, son variables en la literatura.

En el presente estudio la disminución de la proporción de acetato, durante T, coincide con resultados obtenidos, tanto *in vivo* como *in vitro*. En los mismos, aumentando los niveles de CHS, se registró una reducción en la proporción de acetato. Ésta se debería, probablemente, a la disminución de la actividad de los mo digestores de CHE, aumentando las proporciones de propionato y butirato (Khalili y Huhtanen, 1991; Lee et al., 2003). No obstante, en otros experimentos similares, no se observaron cambios en las proporciones de AGV (Sannes et al., 2002; Taweel et al., 2005).

Tal como se observó en este caso, la proporción de propionato en algunos estudios, con rumiantes y con dietas con alto contenido de almidón, no se vió afectada, aunque también se registraron disminuciones en las proporciones de acetato, a favor del butirato (Doreau et al., 2001; Brossard et al., 2003).

Con respecto al butirato, en este trabajo, los resultados indicarían la existencia de una estimulación en el crecimiento de los micro productores de butirato en el rumen, durante T, probablemente debido al mayor contenido de CHS en la pastura. Estudios previos reportaron mayores concentraciones de butirato y similares o levemente más bajas concentraciones de propionato con CHS que con almidones (Heldt et al., 1999). Según Journet et al. (1995), la proporción de ácido butírico en el líquido ruminal es elevada cuando los animales ingieren alimentos muy fermentescibles.

El butirato, que es extensamente metabolizado por el epitelio ruminal (Kristensen, 2005), ha sido previamente citado por el importante rol que juega como fuente de E para las células epiteliales (Bugaut, 1987) y para el animal en general (Seymour et al., 2005). Estos últimos autores, analizando datos de 20 estudios con 92 tratamientos diferentes, en vacas lecheras, encontraron que de los parámetros registrados, la concentración de ácido butírico presenta la relación más fuerte con la producción láctea. De esta manera, el incremento de sus niveles, tal cual se observó en este estudio, para el tratamiento T, podría resultar beneficioso.

En cuanto al valerato, los resultados obtenidos coinciden con los registrados por Voelker y Allen (2003), frente a un bajo pH ruminal, registrando una disminución de la tasa de absorción del mismo. Aunque normalmente la absorción de AGV aumenta cuando el pH disminuye (Dijkstra et al., 1993).

El caproato, que está presente en menor concentración que los AGV de cadena corta en el fluido ruminal (Bergman, 1990), también aumentó significativamente sus concentraciones durante T. Este AGV, que es cetogénico tanto en el epitelio ruminal como en el hígado (Kristensen y Harmon, 2005) y, que es extensamente metabolizado por el epitelio ruminal, además de afectar distintos órganos, interactuaría con el butirato (Chow y Jesse, 1992).

Considerando que el butirato, valerato y caproato son los AGV más extensamente metabolizados por el epitelio ruminal, y que en este caso todos ellos presentaron mayores niveles durante T, surgen posibles explicaciones, e interrogantes a la vez. Una de ellas, y quizás la más probable, es que sus producciones en rumen pudieron haber aumentado debido a las diferencias en los contenidos de CHS de la pastura consumida. Y la otra podría ser, que los bajos niveles de pH registrados en el fluido ruminal hayan conducido a una disminución de la metabolización, y absorción, de los mismos por el epitelio ruminal, aumentando de esta manera su concentración en el líquido ruminal.

Tal como se describió anteriormente, en este estudio no se determinaron producciones de AGV sino concentraciones instantáneas en el líquido ruminal. Y, dado que las variaciones en los porcentajes de los distintos AGV no son un suceso eventual sino el resultado final de un complicado ajuste de la biomasa en el rumen, y de la interacción entre los distintos AGV, la información obtenida al respecto es escasa como para realizar una evaluación precisa de los resultados obtenidos.

8.4. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA EN RUMEN

En relación a la producción de PM, a pesar de que se hubiera esperado que la sincronía de N y E aportados al rumen, durante T, mejorase la síntesis de PM y la salida de N mo desde el rumen, los resultados obtenidos fueron diferentes. Una posible explicación para este fenómeno sería que los mo ruminales no aprovecharon en forma óptima el N-NH₃, resultando en una baja producción de PM.

La no existencia de diferencias en la síntesis de PM entre tratamientos, podría deberse a que éstos se diferenciaron solamente por los contenidos de CHS en la pastura, la cual representó la única fuente de energía administrada a los animales. Ésto está de acuerdo con los resultados observados en algunos trabajos dirigidos a evaluar la sincronización del aporte de N y E al rumen (García et al., 2000; Hristov et al., 2005). Aunque difiere de otros ensayos en los cuales el flujo de N mo al intestino delgado o bien se incrementó, adicionando varios azúcares a la dieta (Khalili y Huhtanen, 1991; Kim et al., 1999), o disminuyó, adicionando sucrosa (Sannes et al., 2002). Los distintos resultados obtenidos entre el presente ensayo y estos últimos, podrían ser atribuidos a las diferencias en la composición de las dietas administradas.

Por otra parte, la excreción urinaria de alantoína, en este caso, aumentó junto con la MODI tal como fue descrito en estudios tempranos utilizando BP (Fujihara et al., 1987; Chen et al., 1990; Pérez et al., 1998).

Con respecto a los valores calculados para la producción de PM diaria en este trabajo, fueron menores que los hallados en algunos ensayos con rumiantes consumiendo forrajes de buena calidad (Dove y Milne, 1994; Elizalde et al., 1998), quizás debido a la alimentación restringida a la que fueron sometidos los animales. Y, aunque han sido reportados resultados del mismo orden que los nuestros, obtenidos también por el método de la alantoína pero con dietas diferentes (Chen et al., 1992; Pérez et al., 1997), no es posible encontrar un valor de producción microbiana que sirva de referencia. Ésto se debe a que son numerosos los factores involucrados en la producción microbiana, entre ellos: aporte de E y de N a los mo, *nivel de alimentación y ritmo de pasaje* (AFRC, 1996).

Si bien uso de la alantoína como marcador microbiano, para algunos autores resulta más preciso que el de todos los derivados púricos excretados en la orina (Puchala y Kulasek, 1992), en este caso podría haber generado cierta subestimación del flujo de N mo, comparado con los derivados púricos totales, tal como fue planteado por Pérez et al. (1997).

En relación a la eficiencia de síntesis microbiana, si bien existen diferentes valores en la bibliografía, en este trabajo difirió bastante del valor promedio propuesto por el ARC (1984), de 30 g N mo/Kg MODR y, del rango de 30-45 g N mo/kg MODR, propuesto para rumiantes consumiendo pasturas de buena calidad (Dove y Milne,

1994; Elizalde et al., 1998). Aunque coincide con los valores estimados para animales consumiendo pasturas de otoño de baja calidad (Dove y Milne, 1994).

Strobel y Russell (1986) propusieron que la E utilizada para mantener el pH intracelular disminuiría la E disponible para el crecimiento microbiano y la eficiencia con que los mo convierten la E y N del alimento en proteína. Por lo tanto, a pesar de que, en este trabajo, no se hallaron diferencias en la síntesis de PM entre tratamientos, pudo haber existido alguna interferencia de los bajos niveles de pH registrados en los animales luego de la comida, y principalmente de tarde, sobre la eficiencia microbiana. Al respecto, Russell y Wilson (1996) propusieron que un bajo pH ruminal disminuiría el crecimiento microbiano a través de la acumulación intracelular de AGV, aunque en este trabajo no se encontraron relaciones entre estos parámetros.

Finalmente, en este ensayo el estudio de la flora microbiana ruminal y la inclusión de algún método, *in vivo* o *in vitro*, capaz de detectar un posible estado de acidosis ruminal en los animales, como ser la evaluación de la degradabilidad de la fibra, podrían haber aportado mucha información. Además, hubiera sido interesante la determinación de los niveles de lactato presentes en el líquido ruminal, y de todos los derivados púricos excretados en la orina.

Futuros estudios deberían incluir estas determinaciones considerando, además, la posibilidad de utilizar otras especies de rumiantes y analizar otros parámetros productivos que podrían ser modificados según el horario de corte de la pastura consumida.

9. CONCLUSIONES

Se concluye que la pastura cortada y administrada por la tarde provocó un menor pH ruminal en los animales.

El porcentaje de ácido acético fue menor para la tarde y las concentraciones absolutas y porcentajes de los ácidos butírico, valérico y caproico fueron mayores cuando el forraje fue cortado y consumido durante la tarde.

A pesar de que los bajos valores de pH ruminal obtenidos, principalmente durante la tarde, representan un riesgo potencial y perjudicial para la flora bacteriana del rumen, la posibilidad de una mayor producción de algunos de los AGV podría resultar benéfica para la misma.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca S., Ibrahim M., Manette L't., Franco M. 1999. Parámetros de fermentación ruminal de animales en pasturas mezcladas gramínea- leguminosa para el trópico húmedo de Costa Rica. *Rev Fac Agron (LUZ)*; 16: 548-552.
2. AFRC (Agricultural and Food Research Council). 1992. Nutritive requirements of ruminant animals: protein. *Nutr Abstr Rev series B*; 62: 787-835.
3. AFRC (Agricultural and Food Research Council). 1996. Necesidades energéticas y proteicas de los rumiantes. Zaragoza, Ed Acribia, 175p.
4. ARC (Agricultural Research Council). Balch C.C., Armstrong D.G., Greenhalgh J.F.D., Miller E.L., Ørskov E.R., Roy J.H.B., Smith R.H., Taylor J.C. 1984. The nutrient ruminant livestock supplement 1. Slough, UK, Commonwealth Agric Bureaux, 351p.
5. A.O.A.C (Assoc of Oficial Agricultural Chemists). 1984. Oficial Methods of análisis. 14th Ed. Arlington, U.S, 1141p.
6. Beauchemin K. A. 1991. Ingestion and mastication of feed by dairy cattle. *Vet Clin North Am. Food Anim Pract*; 7: 439.
7. Beeber D. E., Siddons R.C. 1986. Digestion and metabolism in the grazing ruminant. En: Miligan L.P., Grovum W.L., Dobson A. Control of digestion and metabolism in ruminants. Englewood Cliffs, NJ, Ed. Prentice-Hall, p 479-497.
8. Bergman E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev*; 70: 567-589.
9. Bergman E. N., Wolff J. E. 1971. Metabolism of volatile fatty acids by liver and portal-drained viscera in sheep. *Am J Physiol*; 221: 586-592.
10. Berzaghi, Herbein J.H., Polan C.E. 1996. Intake, site and extent of nutrient digestion of lactating cows grazing pasture. *J Dairy Sci*; 79: 1581-1589.
11. Branine M.E, Galyean M.L. 1990. Influence of grain and monensin supplementation on ruminal fermentation, intake, digesta kinetics and incidence and severity of frothy bloat in steers grazing winter wheat pasture. *J Anim Sci*; 68: 1139-1150.
12. Bryant M. P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed Proc*; 32: 1809-1813.
13. Brossard L., Martin C., Chaucheyras-Duurand F., Michalet-Doreau B. 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reprod Nutr Dev*; 44: 195-206.
14. Brossard L., Martin C., Michalet-Doreau B. 2003. Ruminal fermentative parameters and blood acido-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *Anim Res*; 52: 513-530.
15. Bugaut M. 1987. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol*; 86 B: 439-472.
16. Cajarville C., Curbelo A., Errandonea N., Alonso M., Aguerre M., Repetto J.L. 2000. Efecto 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: XXI Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este, p 146.
17. Cerrato M., Calsamiglia S., Ferret A. 2005. Efectos del tiempo a pH subóptimo y el número de ciclos sobre la fermentación microbiana ruminal en cultivo continuo.

http://www.aida-itea.org/jomada37/3_nutricion/6_RVNII/rvnii-7_cerrato_ciclos2005.pdf. (Fecha de Consulta: 10/05/2006)

18. Chen X.B., Hovell F.D., Ørskov E.R., Brown D.S. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br J Nutr*; 63: 131-142.
19. Chen X.B., Chen Y.K., Franflin M.F., Ørskov E.R., Shand W.J. 1992. The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *J Anim Sci*; 70: 1534-1542.
20. Chow J. C., Jesse B.W. 1992. Interactions between gluconeogenesis and fatty acids oxidation in isolated sheep hepatocytes. *J Dairy Sci*; 75: 2142-2148.
21. Church D.C. 1993. El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, Ed. Acribia, 641p.
22. Corley R.N., Murphy M.R. 2004. An in vitro technique for measuring the production rate of volatile fatty acids in the rumen under dynamic conditions. *Small Rum Res*; 54 : 219-225.
23. De Veth M.J., Kolver E.S. 2001. Prediction of ruminal pH of dairy cows fed pasture. *Proc New Zealand Soc Anim Prod*; 61: 241-243.
24. Dewhurst R. J., Davis D.R., Merry R.J. 2000. Microbial protein supply from the rumen. *Anim Feed Sci Technol*; 85: 1-21.
25. Dijkstra J., Boer H., Van Bruchem J., Bruining M., Tamminga S. 1993. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. *Br J Nutr*; 69: 385-396.
26. Di Marco O.N., Castiñeiras P., Aello M.S. 1998. Ruminal ammonia concentration and energy expenditure estimated by the carbon dioxide entry rate technique. *Anim Sci*; 67: 435-443.
27. Doreau M., Olher A., Michalet-Doreau B. 2001. un casatypique de fermentations ruminales associées à une cétose chez la vache en début de lactation. *Rev Med Vet*; 152: 301-306.
28. Dove H., Milne J.A. 1994. Digesta flow and rumen microbial protein production in ewes grazing perennial ryegrass. *J Agric Res*; 45: 1229-1245.
29. Elizalde J.C., Cremin J.D., Faulkner D.B., Merchen N.R. 1998. Performance and digestion by steers grazing tall Fescue and supplemented with energy and protein. *J Anim Sci*; 76: 1691-1701.
30. 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.
31. Ertfle J.D., Boila R.J., Teather R.M., Mahadevan S., Saber F.D. 1981. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms In Vitro. *J Dairy Sci*; 65: 1457-1464.
32. Eugène M., Archimède H., Michalet-Doreau B., Fonty G. 2004. Effects of defaunation on microbial activities in the rumen of rams consuming a mixed diet (Fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate). *Anim Res*; 53: 187-200.
33. 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.

34. García S.C., Santini F.J., Elizalde J.C. 2000. Nutrition, feeding, and calves. Sites of digestion and bacterial protein synthesis with or without corn or barley grain. *J Dairy Sci*; 83: 746-755.
35. Goering H. K., Van Soest P. J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agriculture Handbook 379*, USDA, 20p.
36. Gosselink J.M.C., Poncet C., Dulohy J-P, Cone J.W. 2003. Estimation of the duodenal flow of microbial nitrogen in ruminants based on the chemical composition of forages: a literature review. *Anim Res*; 52: 229-243.
37. Griggs T. C., MacAdam J.W., Mayland H.F., Burns J. 2005. Nonstructural carbohydrate and digestibility patterns in Orchardgrass swards during daily defoliation sequences initiated in evening and morning. *Crop Sci*; 45: 1295-1304.
38. Heldt J.S., Cachran R.C., Mathis C.P., Woods B.C., Olson K.C., Titgemeyer E.C., Nagaraja T.G., Vanzant E.S., Johnson D.E. 1999. Effects of level and source of carbohydrate and level of degradable protein on intake and digestion of low-quality tall-grass-prairie hay by beef steer. *J Anim Sci*; 77: 2846-2854.
39. Henning P.H., Steyn D.G., Meissner H.H. 1993. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. *J Anim Sci*; 71: 2516-2528.
40. 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. *J Dairy Sci*; 73: 142.
41. Hoover W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J Dairy Sci*; 69: 2755-2766.
42. Hristov A.N., Ropp J.K., Grande K.L., Abedi S., Etter R.P., Melgar A., Foley A.E. 2005. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. *J Anim Sci*; 83: 408-421.
43. Hristov A.N., McAllister T.A., Cheng K.J. 1997. Effect of carbohydrate level and ammonia availability on utilization of alpha-amino nitrogen by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Proc West Sect Am Soc Anim Sci*; 48: 186-189.
44. Jarrige J. 1990. Alimentación de bovinos, ovinos y caprinos. Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INRA), Francia. Ed. Mundi Prensa, 432p.
45. Joo J.W., Bae G.S., Min W.K, Choi H.S., Maeng W.J., Chung Y.H., Chang M. B. 2005. Effect of protein sources on rumen microbial protein synthesis using rumen simulated continuous culture system. *Asian- Australasian J Anim Sci*; 18: 326-331.
46. Jouany J. P., Martin C. 1997. Effect of protozoa in plant cell wall and starch digestion in the rumen, En: Onodera R. et al. (Eds.), *Rumen microbes and digestive physiology in ruminants*. Tokyo, Japan Sci Press: 11-24.
47. Journet M., Huntington G., Peyraud J:L. 1995. Le bilan des produits terminaux de la digestion. En: Jarrige R., Ruckebusch., Demarquilly C., Farce M.H., Journet M. *Nutrition des ruminants domestiques; ingestion et digestion*, Paris, Ed. INRA; 686p.
48. Khalili H., Huhtanen P. 1991. Sucrose supplement in cattle given grass silage-based diet. 1. Digestion of organic matter and nitrogen. *Anim Feed Sci Technol*; 33: 241-261.
49. Khalili H., Sairanen A. 2000. Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Anim Feed Sci Technol*; 84:199.

50. Kim K., Oh Y.G., Choung J., Chamberlain D.G. 1999. Effects of varying degrees of synchrony of energy and nitrogen release in the rumen on the synthesis of microbial protein in cattle consuming grass silage. *J Sci Food Agric*; 79: 833-838.
51. Kim K.H., Lee S.S, Kim K.J. 2005. Effect of intraruminal sucrose infusion on volatile fatty acid production and microbial protein synthesis in sheep. *Asian-Australasian J Anim Sci*; 18: 350-353.
52. Kohn R.A., Dunlap T.F. 1998. Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and *in vitro*. *J Anim Sci*; 76: 1702-1709.
53. Kolver E., Muller L.D., Varga G.A., Cassidy T.J., 1998. Synchronization of ruminal degradation of supplemental carbohydrate with pasture nitrogen in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 81: 2017-2028.
54. Kristensen N.B. 2005. Splanchnic metabolism of volatile fatty acids in the dairy cow. *Anim Sci*; 80: 3-10.
55. Kristensen N.B., Harmon D.L. 2005. Effect of adding valerate, caproate, and heptanoate to ruminal buffers on splanchnic metabolism in steers under washed-rumen conditions. *J Anim Sci*; 83: 1899-1907.
56. Kristensen N.B., Harmon D.L., 2004. Effect of increasing ruminal butyrate absorption on splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. *J Anim Sci*; 82: 3549-3559.
57. Kristensen N. B. Gäbel G., Pierzynowski S. G., Danfer A. 2000. Portal recovery of short-chain fatty acids infused into the temporarily-isolated and washed reticulorumen of sheep. *Br J Nutr*; 84: 477-482.
58. Lapierre H., Berthiaume R., Raggio G., Thivierge M.C., Doepel L., Pacheco D., Dubreuil P., Lobley G.E. 2005. The route of absorbed nitrogen into milk protein. *Anim Sci*; 80: 11-22.
59. Lee M.R.F., Merry R.J., Davies D.R., Moorby J.M., Humphreys M.O., Theodorou M.K. 2003. Effect of increasing availability of water soluble carbohydrates on *in vitro* rumen fermentation. *Anim Feed Sci Technol*; 104: 1-4, 59-70.
60. Marshall S.A., Campbell C.P., Mandell I.B., Wilton J.W. 1992. Effects of source and level of dietary neutral detergent fiber on feed intake, ruminal fermentation, ruminal digestion *in situ*, and total tract digestion in beef cattle fed pelleted concentrates with or without supplemental roughage. *J Anim Sci*; 70: 884-893.
61. Martin C., Philippeau C., Michalet-Doreau B. 1999. Effect of Wheat and corn variety on fiber digestion in beef steers fed high-grains diets. *J Anim Sci* 77: 2269-2278.
62. Martín-Orúe S.M, Dapoza C., Balcells J., Castrillo C. 1996. Purine derivatives excretion in lactating ewes fed straw diet with different levels of fish meal. *Anim Feed Sci Technol* ; 63: 341-346.
63. Mayland H., Mertens D., Taylor B., Burns J., Fisher D., Gregorini P., Ciavarella T., Smith K., Shewmaker G., Griggs T. 2005. Diurnal changes in forage quality and their effects on animal preference, intake, and performance. http://alfalfa.ucdavis.edu/+symposium/proceedings/asdf/alf_symp/2005/05-223.pdf. (Fecha de consulta: 01/02/2006)
64. Maynard L.A, Loosli J.K., Hintz H.F., Warner R.G. ©1981. *Nutrición Animal*, 4a ed. México, Ed. Mc Graw Hill, 640p.
65. Mehrez A. Z., Ørskov E. R., McDonald I. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br J Nutr* 38: 437-443.

66. Miller L.A., Neville M.A., Baker D.H., Evans R.T., Theodorou M.K., MacRae J.C., Humphreys M.O., Moorby J.M. 1999. Milk production from dairy cows offered perennial ryegrass selected for high water soluble carbohydrate concentrations compared to a control grass. Proceedings of the British Society of Anim Sci Annual Meeting, York, UK, p. 208.
67. Mouriño E. J., Akkarawongsa R.A., Weimer P. J. 2001. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J Dairy Sci.* 84: 848-859.
68. Nápoli G.M., Santini F.J. 1988. Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: I. Efecto sobre el medio ambiente ruminal y la degradabilidad proteica. *Rev Arg Prod Anim*; vol. 8, Sup. 1: 39.
69. Nápoli G.M., Santini F.J. 1987. Dinámica de la digestión ruminal de forrajes frescos. *Rev Arg Prod Anim*; 7: 431-447.
70. Nocek J.E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *J Dairy Sci*; 80: 1005-1028.
71. Oba M., Allen M.S. 2003. Effects of diet fermentability on efficiency of microbial nitrogen production in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 86: 195-207.
72. O'Connor J. D., Sniffen C. J., Fox D. G., Chalupa W. 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. *J Anim Sci*; 71:1298-1311.
73. Osborne V.R., Leslie K.E., McBride B.W. 2002. Effect of supplementing glucose in drinking water on the energy and nitrogen status of the transition dairy cows. *Can. J Anim Sci*; 82: 427-433.
74. Owens F.N., Secrist D.S., Hill W.J, Gill D.R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim Sci*; 76: 275-286.
75. Pérez J.F., Balcells J., Cebrián J.A, Martín-Orué S.M. 1998. Excretion of endogenous and exogenous purine derivatives in sheep: effect of increased concentrate intake. *Br J Nutr*; 79: 237-240.
76. Pérez J.F., Bacells 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.
77. 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.
78. Rabelo E., Rezende R.L., Bertles S.J., Grummer R. 2003. Effects of transition diets varying in dietary energy density on lactation performance and ruminal parameters of dairy cows. *Dairy Sci*; 83: 916-925.
79. Rearte D.H., Santini F.J., 1989. Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. *Rev Arg Prod Anim*; 9: 93.
80. Rémond D., Nozière P., Poncet C. 2002. Effect of time of starch supply to the rumen on the dynamics of urea and ammonia net flux across the wall of sheep. *Anim Res*; 51:3-13.
81. Repetto J.L., Britos A., Errandonea N., Cozzolino D., Cajarville C. 2006. Effect of harvest schedule and plant part on in vitro gas production of temperate forages. *J Anim Sci*; 84 (Suppl. 1) / *J Dairy Sci*; 89 (Suppl. 1), p: 102.

82. 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. *Anim Res*; 54: 1-8.
83. Repetto J.L., Errandonea N., Britos A., Cozzolino D., Cajarville C. 2003a. Changes in water soluble carbohydrate contents during the day in Lucern and Fescue cut in autumn. *Proceedings of the British Society of Anim Sci*, York, UK, p: 176.
84. Repetto J.L., Britos A., Cozzolino D., Errandonea N., Cajarville C., 2003b. Nutritive value of Lucern and Fescue during autumn I: relationship between water soluble carbohydrates and nitrogen contents throughout the day. *Proceedings of the IX World Conference on Animal Production*, Porto Alegre, Brasil, p: 26.
85. Repetto J.L., Aguerre M., Alonso M., Curbelo A., Errandonea N., Cajarville C. 2001. Concentración de amoníaco ruminal en vacas en pastoreo, suplementadas con diferentes granos. VII Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo.
86. 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. XVI Reunión Latinoamericana de Producción Animal, Montevideo.
87. Richardson J.M., Wilkinson R.G., Sinclair L.A. 2003. Synchrony of nutrient supply to the rumen and dietary energy source and their effects on the growth metabolism of lambs. *J Anim Sci*; 81:1332-1347.
88. Russell J. 1996. US Dairy Forage Research Center. Informational Conference with dairy and forage industries 61. http://www.dfrc.wisc.edu/Research_Summaries/ind_meet/dfrc9.pdf (Fecha de consulta: 15/07/2006)
89. 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.
90. Russell J.B., Hespell R.B. 1981. Microbial rumen fermentation. *J Dairy Sci*; 64: 1153-1169.
91. Russell J.B., Dombrowski D.B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth of pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl Environ Microbiol*; 39: 604-609.
92. Sannes R.A., Messman M.A., Vagnon D.B. 2002. Form of rumen-degradable carbohydrate and nitrogen on microbial protein synthesis and protein efficiency of dairy cows. *J Dairy Sci*; 85: 900-908.
93. Satter L.D., Slyter L.L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br J Nutr*; 32: 199-208.
94. Seymour W.M., Campbell D.R., Johnson Z.B. 2005. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. *Anim Feed Sci Technol*; 119: 155-169.
95. Shriver B.J., Hoover W.H., Sargent J.P., Crawford R.J., Thayne W.V. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J Dairy Sci*; 69: 413-419.
96. Sniffen C.J., Thomas H.H. 1991. Dairy nutrition management. *Vet Clin North Am, Food Anim Pract*; 7: 632.

97. Strobel H.J., Russell J.B. 1986. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate- limited cultures of mixed rumen bacteria. *J Dairy Sci*; 69: 2941-2947.
98. Taweel H.Z., Tas B.M., Smit H.J., Elgersma A., Dijkstra J., Tamminga S. 2005. Effects of feeding perennial ryegrass with an elevated concentration of water-soluble carbohydrates on intake, rumen function and performance of dairy cows. *Anim Feed Sci Technol*; 121: 243-256.
99. Tebot I., Britos A., Godeau J.M., Cirio A., 2002. Microbial protein production determined by urinary allantoin and renal urea aparing in normal and low protein fed Corriedale Sheep. *Vet Res*; 33: 101-106.
100. Trevaskis L.M., Fulkerson W.J., Gooden J.M. 2001. Provision of certain carbohydrate-based supplements to pasture-feed sheep, as well as time of harvesting of the pasture, influences pH, ammonia concentration and microbial protein synthesis in the rumen. *Aust J Exp Agric*; 41: 21-27.
101. Tripathi M. K., Santra A., Chaturvedi O. H., Karim S. A. 2004. Effect of sodium bicarbonate supplementation on ruminal fluid pH, feed intake, nutrient utilization and growth of lambs fed high concentrate diets. *Anim Feed Sci Technol*. 111: 27-39.
102. Van Soest P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2a. ed., Ithaca, Ed. Cornell University Press, 476p.
103. Voelker J.A., Allen M.S. 2003. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture com:3. Effects on ruminal fermentation, pH and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*; 86: 3562-3570.
104. Yang W.Z., Beauchemin K.A. 2004. Grain processing, forage-to-concentrate ratio, and forage length effects on ruminal nitrogen degradation and flows of aminoacids to the duodenum. *J Dairy Sci*; 87: 2578-2590.
105. Yáñez D.R., Moumen A., Martín A.I., Molina E. 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J Anim Sci*; 82: 2023-2032.
106. Yemm E. W., Willis A. J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J*; 57: 508.