

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**AMBIENTE RUMINAL Y PRODUCCION DE PROTEINA MICROBIANA EN
TERNERAS SEGÚN EL HORARIO DE CORTE DE LA PASTURA CONSUMIDA**

por

Guillermo José CAZZULI ANTELO



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

Orientación: Medicina Veterinaria



MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2010**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa: Lucía Piaggio

Ing. Agr. Lucía Piaggio

Segundo Miembro (Tutor): [Signature]

Dra. Cecilia Cajaville

Tercer Miembro: [Signature]

Dr. Roberto Kremer

Co-tutor: [Signature]

Dr. José Luis Repetto

Fecha: 25 de Octubre de 2010

Autor: [Signature]

Guillermo José Cazzuli Antelo

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 10 (diez)

AGRADECIMIENTOS

A mis viejos, por marcarme el rumbo y ser incondicionales, y también a mi hermana, los tres son imprescindibles en mi vida.

A Cecilia Cajarville y José L. Repetto, por su tutoría, colaboración y su paciencia.

A los integrantes del Dpto. de Nutrición Animal, Alejandro Britos, Sebastián Brambillasca y Analía Pérez, y del Dpto. de Bovinos, Martín Aguerre, por el aporte brindado a esta causa.

A mis compañeros, Lore Bentancor, Xime Gómez, César Echaidés, Marcia De León, Ceci Barboza, Caro Dabarca, Mauri Grundel, Ana Secchi, Sebastián Figueroa, por las horas de estudio (y de joda) compartidas, por todo lo que me han enseñado, y porque, a lo largo de estos años, se han convertido en excelentes amigos.

A Ana, porque es la que siempre está, por su aporte crítico, y porque sin ella no sería lo mismo.

A los que integran o integraron el Servicio de Imagenología de la Facultad de Veterinaria: Sergio Klisich, Álvaro Rodríguez, Victoria Sorriba, Inés Pisón, Sergio Larrosa, Natalia De León, Valeria Berruti, Virginia Olalde, Carolina Silveira, Denise Olivera, Mariana Cattaneo y Silvio Cuadro, por las horas de aprendizaje y trabajo compartido.

A la Asociación de Estudiantes de Veterinaria (A.E.V – A.S.C.E.E.P – F.E.U.U), y con ella a los queridos compañeros que ahí conocí, por el aporte invaluable a mi formación, no solo como profesional sino también, y por sobre todas las cosas, como persona.

A mis amigos, “Rolo”, Pedro, Seba y “Choto”, por las horas y horas de mates en la esquina, picaditos en la calle, “juntadas” en lo de “rolo”, y por las interminables noches de asado y vino que tanto alegraron mi vida, y a Pame, por ser una gran amiga y por estar cuando es necesario.

A mi Barrio, la Villa del Cerro, porque ahí empezó todo...

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. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
3.1. AMBIENTE RUMINAL.....	3
3.1.1. <u>pH</u>	3
3.1.2. <u>Nitrógeno Amoniacal</u>	5
3.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA EN RUMEN.....	6
3.3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS CARBOHIDRATOS DE LAS PASTURAS TEMPLADAS.....	8
4. <u>HIPÓTESIS</u>	9
5. <u>OBJETIVOS</u>	9
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	9
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	9
6. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	10
6.1. ANIMALES, DIETAS Y TRATAMIENTOS.....	10
6.2. MEDICIONES Y CÁLCULOS REALIZADOS.....	11
6.2.1 <u>Composición química de la pastura y heces</u>	11
6.2.2 <u>Ambiente Ruminal</u>	11
6.2.2.1 <u>pH</u>	11
6.2.2.2. <u>Nitrógeno Amoniacal</u>	11
6.2.3. <u>Producción de Proteína Microbiana</u>	11
6.2.3.1 <u>Consumo</u>	12
6.2.3.2. <u>Materia Orgánica Digestible Ingerida (MODI) y Materia Orgánica aparentemente digerida en Rumen (MODR)</u>	12
6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	13
7. <u>RESULTADOS</u>	14
7.1. EVOLUCIÓN DIURNA DE LOS AZÚCARES SOLUBLES DE LA PASTURA OFRECIDA.....	14
7.2. AMBIENTE RUMINAL.....	14
7.3. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA.....	17

7.3.1. Consumo y digestibilidad aparente.....	17
7.3.2. Síntesis de proteína microbiana y eficiencia de síntesis microbiana...	18
8. <u>DISCUSIÓN</u>	20
9. <u>CONCLUSIONES</u>	23
10. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	24

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla I. Disponibilidad y composición química de la pastura consumida por los animales al inicio del diseño experimental.....	10
Tabla II. Contenido de azúcares solubles (AS) y nitrógeno (N), según el horario de corte de la pastura consumida por los animales (M o T) y el período experimental (I, II).....	14
Tabla III. Valores medios de pH ruminal y concentración de N-NH ₃ en el líquido ruminal de terneras alimentadas con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T).....	14
Tabla IV. Ingesta y digestibilidad aparente de MS y MO en terneras alimentadas con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T).....	18
Tabla V. Excreción urinaria de N mo y eficiencia de síntesis microbiana, en terneras alimentadas con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T).....	18
Figura 1. Concentración de N-NH ₃ en el líquido ruminal de terneras alimentadas de mañana o de tarde.....	15
Figura 2. pH ruminal en terneras alimentadas de mañana o de tarde.....	16
Figura 3. pH y concentración de N-NH ₃ en el fluido ruminal de terneras...	17

LISTA DE ABREVIATURAS

- aa: aminoácidos
- AGV: ácidos grasos volátiles
- AS: azúcares solubles o fácilmente fermentescibles
- BP: bases púricas
- CH: carbohidratos
- CHE: carbohidratos estructurales
- CHNE: carbohidratos no estructurales
- DP: derivados púricos
- 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)
- mo: microorganismos
- MO: materia orgánica
- MODI: materia orgánica digestible ingerida
- MODR: materia orgánica aparentemente digerida en rumen
- MS: materia seca
- N mo: nitrógeno microbiano
- ns: no significativo
- 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 algunos aspectos del ecosistema ruminal de terneras que consumen una pradera templada de buena calidad. El mismo se llevó a cabo durante los meses de agosto y octubre en el Campo Experimental n° 2 de la Facultad de Veterinaria. En este estudio 4 terneras Holando canuladas en rumen y confinadas en alojamientos individuales, fueron alimentadas con una pastura fresca cortada a la hora 7:00 (M) o 18:00 (T) e inmediatamente ofrecida durante 2 períodos siguiendo un diseño cruzado. Muestras de líquido ruminal extraídas cada hora durante 24 horas fueron analizadas para pH y amoníaco. A partir de la eliminación urinaria diaria de alantoína y ácido úrico se estimó indirectamente la producción de nitrógeno microbiano y su eficiencia de utilización. El pH ruminal resultó significativamente inferior ($P=0,03$) para M, con mínimos valores para M (5,48) y T (5,81), a 5 y 2 horas luego del comienzo de la ingesta, respectivamente. Los valores de amoníaco fueron significativamente más altos para T ($P<0,001$), y los valores máximos para M (21,96 mg/dl) y T (29,61 mg/dl) se registraron a las 6 y 5 horas luego del comienzo de la ingesta, respectivamente. La síntesis de proteína microbiana tendió a ser mayor en T (98,7 g/d, $P=0,085$). En cuanto a la eficiencia en la síntesis microbiana, no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Palabras clave: pH ruminal, amoníaco, proteína microbiana, pasturas

2. SUMMARY

The aim of this work was to determine the effect of the timing of cut on some aspect of ruminal ecosystem of heifers consuming a high-quality temperate pasture. The same was carried out during the months of August and October in the Experiment : of the Veterinary Faculty. In this study 4 rumen cannulated Holstein heifers and confined in individual accommodation, were fed fresh pasture cut at the time 7:00 (M) or 18:00 (T) and immediately offered during 2 periods following a crossover design. Samples of ruminal liquor extracted each hour during 24 hours were analyzed for pH and ammonia. Microbial nitrogen production and its utilization efficiency were indirectly estimated by daily urinary excretion of allantoin and uric acid. The rumen pH was significantly lower ($P=0,03$) for M, with minimum values for M (5.48) and T (5.81), 5 and 2 hours after the start of intake, respectively. Ammonia levels were significantly higher for T ($P=<0,001$), and maximum values for M (21.96 mg / dl) and T 29.61 mg / dl) were recorded at 6 and 5 hours after the start of intake, respectively. Microbial protein synthesis tended to be higher in T (98.7 g / d, $P=0,085$). As for the efficiency of microbial synthesis, no significant differences between treatments.

Key words: ruminal pH, ammonia, microbial protein, pastures

3. INTRODUCCIÓN

El aporte de nutrientes en el vacuno depende en gran medida de la actividad de la población microbiana de su rumen. Los sustratos degradables de los alimentos son fermentados por los microorganismos, y los productos finales de la misma son absorbidos a través de las paredes del rumen. Junto a este proceso las bacterias se multiplican generando una masa microbiana que luego es degradada cuando llega al intestino delgado (Santini y Elizalde, 1994).

En el Uruguay, la alimentación de los rumiantes se basa principalmente en la utilización de forrajes frescos a través del pastoreo directo durante todo el año. En trabajos realizados en el Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria (Uruguay) se ha observado un aumento en los azúcares solubles (AS) durante la tarde repercutía en el ambiente ruminal de los ovinos que la consumían (Pérez, 2006). Este mismo grupo de trabajo observó que los ovinos serían más propensos a alteraciones en el aprovechamiento digestivo debidas al aumento de carbohidratos no estructurales en la dieta (Aguerre et al., 2009a; Aguerre et al., 2009b). A partir de esta información, es de interés determinar las repercusiones que pueda tener el horario del día en que se pastorea una pastura templada, tanto en la actividad bacteriana y digestibilidad del forraje como en la producción de proteína microbiana (PM) a nivel ruminal de terneras.

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).

3.1.1. pH

De todos los factores del medio ruminal, el pH es el más susceptible a variación, y la ración es el factor más determinante de los cambios (Calsamiglia y Ferret, 2002). La mayoría de los microorganismos 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 variaciones de pH pueden afectar a la flora microbiana y a la fermentación ruminal, todo esto perjudicará el consumo y la performance animal (Russell et al, 1992).

El pH ruminal depende fundamentalmente de 3 factores: de la producción de ácido, de la capacidad tampón del medio ruminal y de la eliminación de protones por absorción o flujo al tracto digestivo inferior (Calsamiglia y Ferret, 2002). Para que su pH se mantenga dentro de valores normales, el rumen cuenta con tres sistemas buffer: el del bicarbonato, el de los fosfatos y el de los Ácidos Grasos Volátiles (AGV). En general, permanece bien amortiguado gracias al bicarbonato aportado por

las secreciones salivares (Rearte y Santini, 1989). En algunas ocasiones, los productos ácidos de la fermentación exceden la capacidad tampón, produciendo un gran descenso del pH ruminal. Los bajos pH afectan la fermentación ruminal (Cerrato-Sánchez et al., 2007).

El pH del rumen varía considerablemente durante el día (Krause y Oetzel, 2006). Cuando el pH alcanza valores inferiores a 6 la actividad de los microorganismos (mo) fermentadores de carbohidratos estructurales se ve disminuida, siendo que sus niveles son elevados con dietas forrajeras. Por el contrario, los mo que fermentan carbohidratos solubles (azúcares) o fácilmente fermentescibles persisten aún con valores de pH inferiores a 5 (Van Soest, 1994). Al respecto, se ha indicado que con un pH por debajo de 6 se reducen los mo celulolíticos y se ve severamente limitada la digestión de la fibra (Hoover, 1986; Calsamiglia et al., 2002). Según Cerrato-Sánchez et al (2007) los mayores efectos del pH sobre la fermentación ruminal tienen lugar tan pronto como el mismo empieza a ser subóptimo. Asimismo, los mayores efectos se dan en las primeras 12 h, y en la mayoría de los casos, durante períodos más largos sólo encontraron pequeños efectos adicionales. Sin embargo, otros autores no encontraron ningún efecto sobre la fermentación microbiana ni en la síntesis proteica (Rotger et al., 2006).

En general se acepta que una dieta alta en forraje produce un pH ruminal elevado (6,6-6,8), ya que induce a una gran actividad de rumia y alta producción de saliva, promoviendo el crecimiento de bacterias que digieren celulosa y hemicelulosa, cuyo producto final principal es el acético. Por el contrario, un alto nivel de concentrado determinará un pH bajo (5,8-6,0), lo que promoverá una actividad amilolítica con incremento marcado de producción de ácido propiónico y láctico (Santini y Elizalde, 1994). La acumulación de lactato en el rumen conduce a acidosis, a una disminución en la digestión de la fibra, disminución de la ingestión, y, en casos extremos, incluso a la muerte (Slyter, 1976). Según Owens et al (1998), un estado de acidosis subaguda surgiría con pH inferiores a 5,6. Estudios *in vitro* indican que la eficiencia en la síntesis de proteína microbiana puede disminuir significativamente con valores de pH menores a 6 (Strobel y Russell, 1986). Sin embargo, Rotger et al (2006), simulando una acidosis subclínica *in vitro*, no encontraron efectos en la digestibilidad de la materia orgánica (MO), en la fermentación microbiana ni en el metabolismo del nitrógeno. Los protozoarios presentes en el rumen jugarían un rol importante en la prevención del desarrollo de acidosis (Brossard et al., 2004). Por ello, la disminución de la cuenta de protozoos ciliados podría ser un indicador microbiano útil de condiciones inestables o de potencial acidosis dentro del rumen (Goad et al., 1998).

En nuestro país, consumiendo dietas basadas en forrajes, los rumiantes mantienen el pH ruminal promedio dentro del rango normal esperado (de 6,2 – 6,8) (Pérez, 2006; Cajarville et al., 2006). Dichos resultados coinciden con los obtenidos en otros trabajos con rumiantes a pastoreo (Abarca et al., 1999). Sin embargo, Pérez et al. (2006), observaron, en rumiantes alimentados con forraje durante períodos restringidos, valores de pH ruminal, en promedio, inferiores a lo esperado. Incluso, ese mismo grupo, observó un pH menor en los animales que se alimentaron en la tarde. El mayor contenido en azúcares solubles de la planta durante la tarde podría explicar el descenso del pH. Según Repetto et al. (2006), los forrajes cosechados en la tarde presentan mayor contenido de azúcares solubles y una mayor fermentescibilidad.

3.1.2. Nitrógeno Amoniacal (N-NH₃)

FACUL

Del nitrógeno (N) que llega al rumen hay que diferenciar entre las fuentes exógenas procedentes del alimento y las fuentes endógenas aportadas por el propio rumiante. Las fuentes de N de la dieta incluyen urea, otros compuestos nitrogenados no proteicos y proteína. Las fuentes endógenas incluyen urea reciclada en la saliva o a través del epitelio del tracto digestivo y células epiteliales de descamación. Los productos nitrogenados no proteicos y una cantidad variable de la proteína verdadera son degradados hasta nitrógeno amoniacal (N-NH₃) en el rumen (Martínez Marín, 2009).

La mayoría de las bacterias del rumen pueden utilizar N-NH₃ como fuente de nitrógeno para el crecimiento (Russell, 1996). Este es utilizado como única fuente por las bacterias celulolíticas mientras que las bacterias que fermentan los carbohidratos no estructurales satisfacen con él en torno a un tercio de sus necesidades nitrogenadas (Russell et al., 1992).

Los microorganismos ruminales a menudo producen un exceso de N-NH₃ (Russell 1996). El N-NH₃ que no es utilizado es absorbido en el aparato digestivo. La absorción aumenta con el gradiente de concentración y el pH (Chalupa, 1968). El N-NH₃ es transformado en urea en el hígado. Una vez liberada en la sangre, la urea se excreta en la orina o vuelve a entrar en el tracto digestivo en la saliva o directamente por difusión a través de la pared intestinal (Huntington y Archibeque, 1999). Según estos mismos autores, el porcentaje de urea hepática que es reciclada por vía salival al rumen es muy variable. La importancia relativa del reciclado a través de la saliva aumenta con el contenido de forraje de la dieta (Lapierre y Lobley, 2001). Todo este proceso de reciclaje de la urea podría resultar en una ventaja productiva en determinadas situaciones de carencia de N, ya que, aproximadamente 20% del N-NH₃ absorbido se originaría de esa urea reciclada antes que del alimento degradado (Lapierre et al., 2005).

A su vez, numerosos trabajos muestran que la producción de animales consumiendo forrajes de alta calidad fue menor que la esperada. Cuando se consumen este tipo de pasturas, con un alto contenido de N y una alta degradabilidad, se produce una liberación muy rápida de N, no habiendo liberación de energía con la misma velocidad. Como consecuencia, considerables cantidades de N-NH₃ son absorbidas directamente del rumen y de esa manera, no puede ser utilizado para la síntesis de proteína microbiana (Santini y Elizalde, 1994).

La disponibilidad de carbohidratos para la fermentación ruminal constituye un factor clave para lograr una mejoría en la eficiencia de utilización del N-NH₃ ruminal, y de N de la dieta, por los rumiantes. Para lograr una máxima eficiencia de síntesis microbiana, el nitrógeno y la energía disponible en el rumen deben estar balanceados (Santini y Elizalde, 1994). De esta manera, si la pastura no aporta las cantidades necesarias de carbohidratos de fácil fermentación, se verá limitada la cantidad de energía presente en el rumen. Esto trae como consecuencia que la degradación de las proteínas de la dieta a N-NH₃, por parte de los microorganismos, y la captación de N-NH₃ por los mismos, se vean también limitadas (Hristov et al., 1997).

Según Hristov et al. (2005), la administración de energía fácilmente fermentable en rumen puede disminuir la concentración de N-NH₃ ruminal. Esto se produciría a través de una mejoría en la captura del N-NH₃ destinado a la síntesis de PM, entre otras causas.

Por otra parte, existen diversas opiniones acerca del nivel de N-NH₃ necesario para un óptimo crecimiento microbiano en el rumen. Para Van Soest (1994), la producción microbiana del rumiante requiere una concentración de N-NH₃ de al menos 5-8 mg/dl.

Para Satter y Slyter (1974), la concentración óptima de N-NH₃ en el rumen para un máximo rendimiento de los microorganismos es de solamente 5 mg/dl.

Sin embargo, según Mehrez et al (1977), para una óptima tasa de digestión ruminal serían necesarias concentraciones de 23,5 mg/dl de N-NH₃.

Trabajos realizados en Uruguay demuestran que las concentraciones de N-NH₃ ruminal, en vacas adultas, corderos y vaquillonas superaron el nivel mínimo necesario para una adecuada producción microbiana con un valor promedio de 20,1 mg/dl, 18,16 mg/dl y 20,79 mg/dl respectivamente, y por lo tanto no serían la limitante para el crecimiento bacteriano (Repetto et al., 2001; Pérez, 2006; Aguerre, 2010).

3.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA EN RUMEN

Los aminoácidos que llegan al duodeno pueden tener tres orígenes diferentes: la proteína microbiana (PM) sintetizada en el rumen, la proteína del alimento que no ha sido degradada y la proteína endógena (descamaciones celulares, jugos digestivos, etc.). La PM constituye, generalmente, una proporción considerable del flujo duodenal de nitrógeno aminoacídico en los rumiantes (Carro, 2001). Al respecto, según Sniffen y Robinson (1987), la proteína microbiana representa entre el 40 y el 80 % de los aminoácidos que llegan al intestino delgado, aunque en ocasiones puede alcanzar el 100 % (AFRC, 1992). Los MO del rumen tienen un perfil de aminoácidos muy cercano al requerido por los rumiantes (O'Connor et al., 1993). 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 aporte de nitrógeno microbiano al animal varía entre 14 y 60 g N mo /kg MODR (ARC, 1984).

La utilización de ácidos nucleicos y de bases púricas (BP) como marcadores microbianos, para estimar la producción de PM, se basa en las altas concentraciones de ADN y, especialmente, de ARN presentes en los organismos unicelulares. Las purinas que llegan al duodeno pueden ser absorbidas y posteriormente reutilizadas por el animal o metabolizadas y excretadas en la orina en forma de alantoína y otros metabolitos. Debido a ello se ha propuesto que la excreción urinaria de derivados púricos (DP) puede constituir un parámetro válido para estimar el flujo duodenal de proteína microbiana (Carro, 2001). El método que

se basa en la determinación indirecta de las BP, es una técnica no invasiva, con lo que posibles trastornos en el comportamiento alimentario de los animales o en su motilidad digestiva, producidos por la implantación de cánulas, quedan descartados (Calsamiglia et al., 1996). Las purinas de los microorganismos ruminales que llegan al duodeno son absorbidas rápidamente a través de la mucosa intestinal, en forma de nucleósidos o como bases libres, si bien en el ganado vacuno sufren una cierta degradación a ácido úrico en su paso por la mucosa (Carro, 2001). Las purinas absorbidas se transportan hasta el hígado, donde tiene lugar su utilización y degradación. Tras su metabolismo, las purinas se excretan en la orina en forma de alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina, aunque en el ganado vacuno las cantidades de estos dos últimos compuestos son insignificantes (Verbic *et al.*, 1990). Solamente la alantoína y el ácido úrico están presentes en el vacuno por la alta actividad de la xantina oxidasa en la sangre y en los tejidos (incluyendo el riñón), convirtiendo la xantina y la hipoxantina en ácido úrico previamente a la excreción en la orina (Valadares et al 1999).

A su vez, la producción de proteína microbiana en el rumen está influenciada por la cantidad y forma de los carbohidratos disponibles (energía), nivel proteico de la dieta (Hristov et al, 1997), y el nivel de ingesta (Heldt et al, 1999). Por lo tanto, la sincronización de la energía y N en el rumen parece incrementar la producción de proteína microbiana y la eficiencia de la fermentación ruminal, mejorando así la utilización del alimento y el rendimiento de los animales (Santini y Elizalde, 1994; Cabrita et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, en nuestro país la limitante no es la concentración de N-NH₃ ruminal, ya que los estudios demuestran que se superara el nivel mínimo necesario para una adecuada producción microbiana. Lo que sí podría ocurrir es un desbalance entre N y energía y, por lo tanto, una baja eficiencia en la síntesis de PM.

Según Cabrita et al (2006), es contradictorio el supuesto beneficio que se obtiene al sincronizar energía y nitrógeno en el rumen, ya sea ésta alcanzada cambiando los ingredientes dietéticos, o alterando la frecuencia o los patrones de alimentación, tanto para la eficaz síntesis de PM como para maximizar la producción.

Algunos estudios *in vivo*, como el de Herrera-Saldana et al. (1990), muestran que la sincronización nitrógeno-energía (N-E) promueve un aumento de la producción y una mayor eficiencia en la síntesis de proteína microbiana. Sin embargo, otros estudios *in vivo* no han mostrado mejoría en la síntesis de PM debido a la sincronía de N-E en rumen (Richardson et al., 2003). Además, estudios *in vitro*, muestran que la asincronía entre N y E en rumen tiene efecto sólo a corto plazo sobre el crecimiento bacteriano (Newbold y Rust, 1992).

3.3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS CARBOHIDRATOS DE LAS PASTURAS TEMPLADAS

Las pasturas de clima templado de alta calidad presentan, frecuentemente, niveles adecuados de N pero bajos de AS para una óptima fermentación ruminal, lo que lleva a una baja eficiencia en la utilización de N por parte de los microorganismos ruminales (Rearte y Santini, 1989).

Los carbohidratos (CH) de las plantas pueden ser clasificados en tres categorías, desde un punto de vista fisiológico: a- polisacáridos estructurales, principalmente pectinas, celulosa y hemicelulosas; b- azúcares simples; y c- componentes de reserva temporaria como fructanos y sucrosa (Van Soest, 1994).

La luz es la principal fuente de energía para la planta y son los carbohidratos la principal reserva de energía fotosintética. La reserva de carbohidratos 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 azúcares solubles aumenta en el curso del día llegando a un máximo al atardecer, disminuyendo luego hasta el comienzo del nuevo día (Smith, 1973; Mayland et al., 2005) provocando una dilución de los componentes de la pared celular (Mayland et al., 2005).

A su vez, se ha observado que los herbívoros muestran una marcada preferencia por el forraje cosechado en la tarde (PM) vs. la mañana (AM), y que son capaces de distinguir entre henos cosechados AM y PM que difieren en por lo menos 0,5% en su contenido de azúcares solubles (Mayland et al., 2005). Estos resultados coinciden con lo mencionado por Orr et al. (1997) quienes señalaron que los rumiantes seleccionan la pastura que van a consumir según su contenido de AS, entre otros factores.

En nuestro país, con respecto a la magnitud de variación de la concentración de azúcares solubles en los forrajes, Repetto et al (2003a), muestreando parcelas de especies puras de gramíneas y leguminosas durante el otoño, en diferentes cortes y en 3 momentos del día (mañana, mediodía y tarde), registraron un importante incremento en los contenidos de azúcares solubles, en promedio un 75% para alfalfa y un 110% para festuca, en el correr del día. Dichos resultados coinciden con el aumento de carbohidratos no estructurales totales durante la tarde, comparado con la mañana, obtenidos por Griggs et al. (2005). A su vez, se observó, que la relación de azúcares/materias nitrogenadas de la planta aumentó en la tarde en comparación con la mañana, ya que el contenido en materias nitrogenadas tiende a mantenerse constante (Repetto et al, 2003b; Antúnez y Caramelli, 2009). En otros trabajos, se midieron mayores volúmenes y tasas de producción de gas que se atribuyeron a aumentos en el contenido de azúcares solubles en las pasturas en el correr del día (Britos et al., 2006; Repetto et al., 2006).

A partir de esta información, es de interés estudiar el momento del día donde los nutrientes aprovechables por el rumiante son máximos, para así desarrollar una estrategia que permita usar estos recursos de manera eficiente con manejos sencillos.

4. HIPÓTESIS

El consumo de una pradera templada por terneras durante la tarde, determinará un descenso del pH y una mayor captación de N-NH₃, así como una mayor síntesis de proteína microbiana en el rumen con relación a la misma pradera consumida en la mañana, ya que la pastura contendría más azúcares solubles durante la tarde.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el momento del día en que terneras consumen una pradera templada de buena calidad tiene repercusión en el sistema ruminal.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

-Evaluar si el momento del día en que se corta y ofrece una pradera de buena calidad, afecta la dinámica y los niveles de pH y de amoníaco a nivel ruminal en terneras.

-Estudiar si el momento del día en que se corta y ofrece una pradera de buena calidad, tiene efecto sobre la síntesis de proteína microbiana a nivel ruminal de terneras.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

3 - FACLU

El experimento fue realizado en el Campo Experimental N° 2 (Departamento de San José, 34° sur y 55° oeste), durante los meses de agosto y octubre, y en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria.

6.1. ANIMALES, DIETAS Y TRATAMIENTOS

Para la realización del experimento se utilizaron 4 terneras Holando ($145 \pm 5,3$ kg PV) canuladas en el rumen, las que se mantuvieron confinadas en alojamientos individuales, con libre acceso al agua, durante todo el período experimental. La dieta administrada a los animales consistió en una pradera de buena calidad, en estado vegetativo, compuesta por una mezcla de 90% gramíneas y 10% leguminosas. La gramínea que predominaba era la Avena (*Avena sativa*), y dentro de las leguminosas se encontraban trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol blanco (*Trifolium repens*) y lotus (*Lotus corniculatus*). La composición química al inicio del ensayo era la siguiente (ver tabla I):

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

kg MS/ha	MS,%	FND, %*	FAD, %*	PB, %*	AS, %*
4400	14,7	49,9	26,8	14,4	9,3

MS: materia seca, FND: fibra neutro detergente, FAD: fibra ácido detergente, PB: proteína bruta, AS: azúcares solubles, *: datos expresados en base seca.

Se llevaron a cabo dos tratamientos diferentes en un diseño de tipo cruzado:

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

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.

La pradera fue cortada y suministrada en comederos inmediatamente después del corte, 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), en una única comida diaria.

Durante el experimento, en el último día de cada período, se procedió a la extracción de muestras de líquido ruminal para la posterior determinación del pH. Muestras de cada extracción fueron almacenadas para analizar las concentraciones de N-NH₃. Se determinó el volumen de orina eliminada por los animales en cada período experimental, almacenando muestras para la determinación de alantoína y de ácido úrico.

6.2. MEDICIONES Y CÁLCULOS REALIZADOS

6.2.1 Composición química de la pastura y heces

Se realizaron análisis de composición química de la pradera (oferta y rechazo) y de las heces para MS (por el secado de las muestras, a 60°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). El contenido de azúcares solubles 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 Ambiente Ruminal

El último día de cada período (día 17), muestras de líquido ruminal fueron extraídas de cada animal canulado, cada hora durante 24 h. A partir de las mismas se estudiaron la evolución diaria del pH y de las concentraciones de N-NH₃.

6.2.2.1 *pH*

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

6.2.2.2. *Nitrógeno Amoniacal*

De cada extracción se congeló una muestra (10 ml), utilizando cloruro de sodio al 20% (10 ml) como conservante. La concentración de N-NH₃ ruminal fue determinada por destilación directa de la muestra con tetraborato de sodio.

6.2.3. Producción de Proteína Microbiana

Se colectó la totalidad de la orina emitida por día por las terneras, durante 5 días de cada período experimental, para la determinación de derivados púricos, alantoína y ácido úrico. Los mismos fueron determinados para cada animal, a partir de muestras de orina (de 30 ml) colectadas diariamente y congeladas, a las cuales se les agregó como conservante una solución de ácido sulfúrico al 10 %.

Los niveles de alantoína en la orina y el ácido úrico en la orina se determinaron por método colorimétrico, según la metodología de Fujihara et al. (1987), descrito por Chen y Gomes (1995).

La excreción total de derivados púricos fue calculada por la suma de las cantidades de alantoína y ácido úrico excretadas en la orina.

Las purinas absorbidas (X , mmol/día) fueron calculadas a partir de la excreción de los derivados púricos (Y , mmol/día, considerando 158 mg/mmol de alantoína y 168 mg/mmol de ácido úrico), en base a la ecuación descrita por Chen y Gomes (1995):

$$X = (Y - 0,385 \times PV^{0.75}) / 0,85$$

El flujo de nitrógeno microbiano a intestino (Y , gN/día) fue calculado en función de las purinas microbianas absorbidas (X , mmol/día), utilizándose la ecuación:

$$Y = (70X) / (0,83 \times 0,116 \times 1000),$$

asumiendo una digestibilidad de las purinas microbianas de 0,83, un contenido de nitrógeno en las purinas de 70 mgN/mmol y una relación N de purinas/N total de 0,116 (Chen y Gomes, 1995).

Además, la eficiencia de producción de PM en el rumen, fue expresada como: g de N mo por kg de MO ingerida (g N mo/kgMOing.), g de N mo por kg de MODI (g N mo/kgMODI) y como g de N mo por kg de MODR (g N mo/kgMODR). Para ello se procedió a la determinación de consumo y digestibilidad *in vivo*, tal como se describe a continuación

6.2.3.1 Consumo

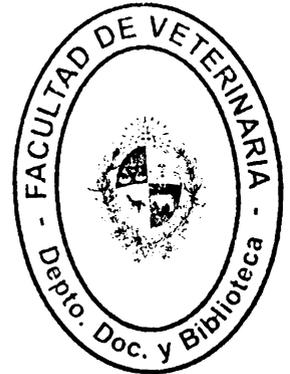
El consumo de cada animal fue determinado por diferencia entre la MS ofrecida y la rechazada. El mismo fue expresado como MS ingerida (kg/día), obtenida a partir de: MS ofrecida (kg) – MS rechazada (kg), y como MO ingerida (kg/día), obtenida a partir de: MO ofrecida (kg) – MO rechazada (kg).

6.2.3.2. *Materia Orgánica Digestible Ingerida (MODI) y Materia Orgánica aparentemente digerida en Rumen (MODR)*

Se pesaron 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.

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los parámetros de fermentación ruminal, fueron comparados entre tratamientos utilizando un procedimiento de medidas repetidas, usando un modelo mixto (PROC MIXED), considerando los efectos período, horario, tratamiento, animal y la interacción tratamiento x hora. El contenido diario de AS y N de la pastura fueron comparados, entre tratamientos, utilizando el modelo general lineal (GLM). 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. En todos los casos se declararon diferencias significativas cuando $P < 0,05$.



7. RESULTADOS

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

El contenido de azúcares solubles (AS) y nitrógeno (N) de la pastura ofrecida a los animales se presenta en la tabla II. En la misma se puede apreciar un mayor contenido de AS, en la pastura ofrecida a los animales, durante la tarde. Al mismo tiempo se produjo la disminución porcentual del contenido nitrogenado de la pastura

Tabla II. Contenido de azúcares solubles (AS) y nitrógeno (N), según el horario de corte de la pastura ofrecida (M o T) y el período experimental (I, II). Datos expresados en base seca.

	Período Experimental				M vs T	
	I		II		ESM	P
	M	T	M	T		
AS, %	7,99	10,6	20,3	22,9	0,312	0,003
N, %	1,72	1,61	1,20	1,16	0,030	ns

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. AMBIENTE RUMINAL

En la tabla III se presentan los valores promedio de pH y concentración de N-NH₃ ruminal.

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

	M	T	ES	P		
				t	h	txh
N-NH ₃ , mg/dl	10,93	14,62	3,222	<0,001	<0,001	ns
pH	6,38	6,48	0,1576	0,03	<0,001	ns

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

Tal como puede observarse en la Tabla III, fueron halladas diferencias significativas para la concentración de N-NH₃ ruminal, entre tratamientos (P < 0,001) y entre las distintas horas de cada tratamiento (P < 0,001). Además, la interacción t x h no fue

significativa, ya que la forma de las curvas de $N-NH_3$ fueron similares para ambos tratamientos (Figura 1).

En la Figura 1 se observa la concentración de $N-NH_3$ en el líquido ruminal de las terneras a lo largo de 24 horas. En ella puede observarse un incremento producido a partir del comienzo de la ingesta (hora 0). El mismo alcanzó un valor máximo, para los animales alimentados durante la mañana, de 21,96 mg/dl a la hora 6, y para los animales alimentados durante la tarde de 29,61 mg/dl a la hora 5. El valor mínimo registrado fue de 5,6 mg/dl y se dio a la hora 19 (M).

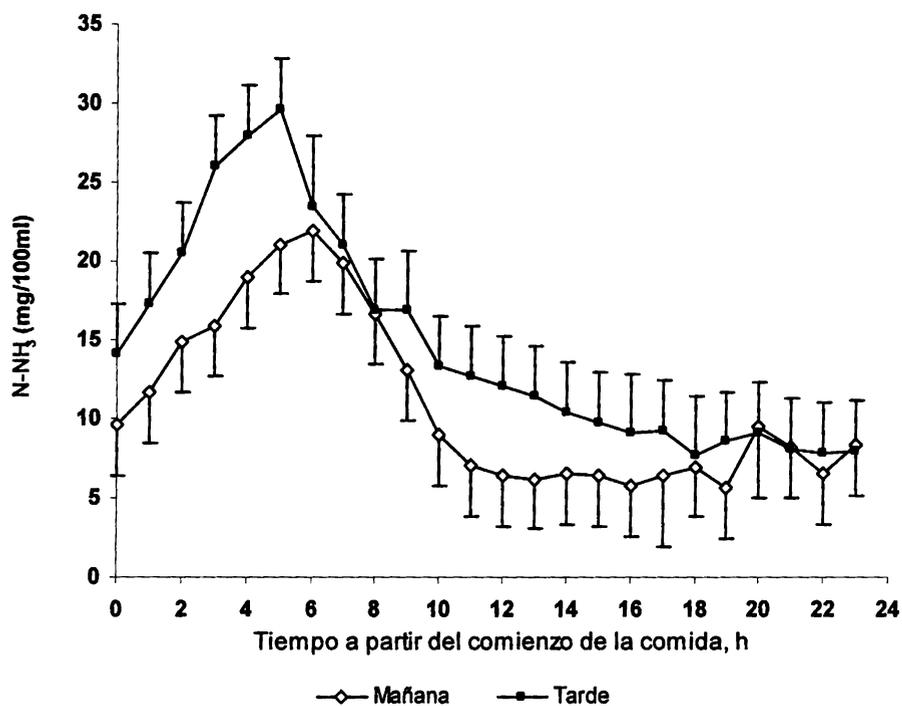


Figura 1. Concentración de $N-NH_3$ en el líquido ruminal de terneras alimentadas de mañana o de tarde (Medias \pm error estándar).

Con respecto al pH ruminal de los animales (Figura 2) se constató que éste disminuyó luego de la ingesta (hora 0). Esta disminución persistió aproximadamente hasta la hora 5 (M) y 2 (T).

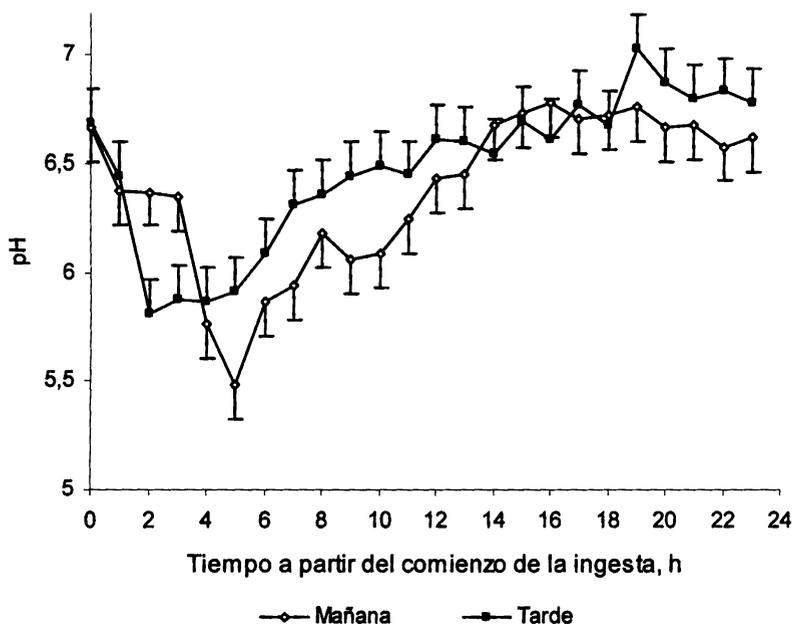


Figura 2. pH ruminal en terneras alimentadas de mañana o de tarde. Medias \pm error estándar.

En cuanto a los valores medios de pH obtenidos (Tabla III) se halló una diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0,03$). Sin embargo la interacción $t \times h$ no fue significativa.

Además, se constataron diferencias significativas entre las distintas horas de cada tratamiento (Tabla III).

Los valores mínimos de pH fueron inferiores para M, con valores de 5,48 y 5,81, 5 y 2 horas luego del comienzo de la ingesta (M y T respectivamente).

En la Figura 3 se representan los valores medios de ambos tratamientos (M y T) tanto de pH como de $N-NH_3$, a lo largo de las 24 horas. En la misma se puede apreciar que las curvas se presentan en forma de espejo. Esto muestra que los momentos en que la concentración de $N-NH_3$ fue máxima coinciden con los de mínimo pH.

También se puede observar en la figura 3 que entre las horas 2 y 7 a partir de la ingesta se registraron niveles de pH inferiores a 6,2. Además, los valores medios de $N-NH_3$ nunca estuvieron por debajo de 5 mg/dl.

Los valores mínimos de pH fueron simultáneos con las máximas concentraciones de $N-NH_3$, presentando una correlación negativa baja pero significativa entre ambos parámetros ($r = -0,43$; $P < 0,001$; $n = 182$).

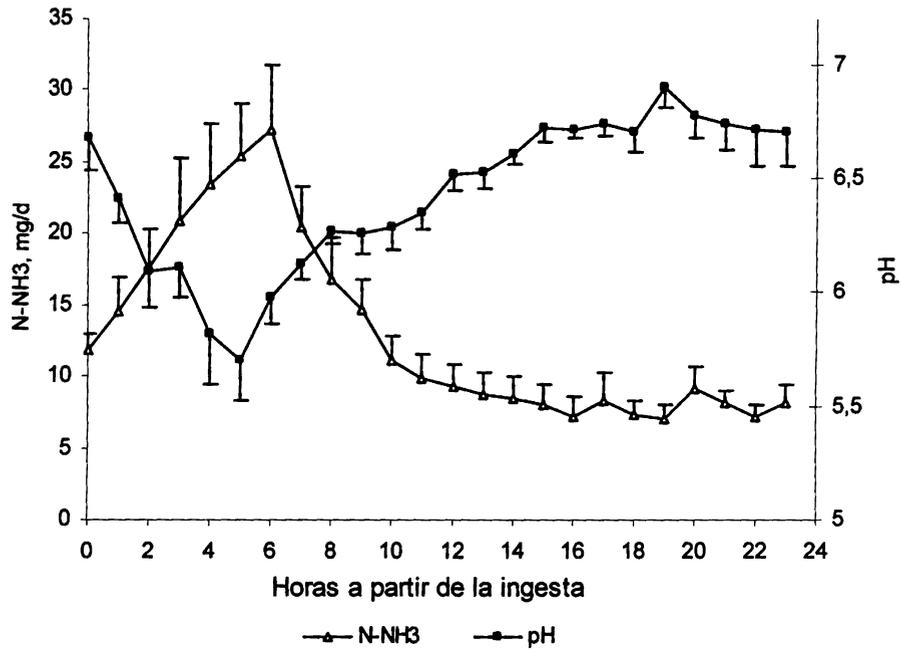


Figura 3. pH y concentración de N-NH₃ en el fluido ruminal de terneras. Medias ± error estándar.

7.3. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA

7.3.1. Consumo y digestibilidad aparente

Las cantidades de MS y MO que fueron ingeridas y digeridas por los animales, así como también la MODI y la cantidad de MODR se presentan en la tabla IV. En la misma se puede observar que tanto las cantidades de MS y MO ingeridas por los animales, así como también la MODI y la cantidad de MODR, fueron similares para ambos tratamientos.

Tabla IV. Ingesta y digestibilidad aparente de MS y MO en terneras alimentadas con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T).

	M	T	ESM	P
Ingesta, kg/d				
MS	3,35	3,31	0,501	ns
MO	3,04	3,01	0,460	ns
Digestibilidad aparente, kg/d				
MS	0,788	0,744	0,048	ns
MO	0,793	0,757	0,043	ns
MODI, kg	2,41	2,36	0,433	ns
MODR, kg	1,57	1,53	0,281	ns

MS: materia seca, MO: materia orgánica, MODI: materia orgánica digerible ingerida, MODR: materia orgánica aparentemente digerida en rumen. ESM: error estándar de las medias, P: probabilidad estadística, ns: no significativo ($P>0.05$).

7.3.2. Síntesis de proteína microbiana y eficiencia de síntesis microbiana

La síntesis de proteína microbiana y la eficiencia de síntesis microbiana se presentan en la Tabla V.

Tabla V. Excreción urinaria de N mo y eficiencia de síntesis microbiana, en terneras alimentadas con forraje fresco cortado durante la mañana (M) o la tarde (T).

	M	T	ESM	P
Síntesis de proteína microbiana:				
N mo (g/d)	70,23	98,7	6,276	0,085
Eficiencia de síntesis de proteína microbiana:				
g N mo/kgMOing.	24,42	34,19	4,215	ns
g N mo/kgMODI	30,72	47,25	8,71	ns
g N mo/kgMODR	47,26	72,70	13,41	ns

ESM: error estándar de las medias, P: efecto tratamiento, ns: no significativo ($P>0.05$), g N mo/kgMOing.: gramos de nitrógeno microbiano por kilo de materia orgánica ingerida, g N mo/kgMODI: gramos de nitrógeno microbiano por kilo de materia orgánica digerible ingerida, g N mo/kgMODR: gramos de nitrógeno microbiano por kilo de materia orgánica aparentemente digerida en rumen

En la misma puede observarse que la síntesis de proteína microbiana tendió a ser mayor para T ($P= 0,085$).

En cuanto a la eficiencia en la síntesis microbiana, si bien los valores absolutos observados para la tarde fueron muy superiores, las diferencias halladas entre ambos tratamientos no resultaron significativas.



8. DISCUSIÓN

En este trabajo, la concentración de N-NH₃ en el líquido ruminal superó, en ambos tratamientos y ambos períodos experimentales, los niveles que se consideran limitantes para la síntesis de PM (5-20 mg/ml).

Aunque se hubiera esperado una menor concentración de N-NH₃ ruminal por un mayor aprovechamiento de éste por parte de los mo, debido a una mayor provisión de energía fácilmente fermentable al rumen, lograda durante T, esto no se observó en este ensayo. Sucedió exactamente lo contrario, el N-NH₃ aumentó durante T.

Según Hristov et al. (2005), la administración de energía fácilmente fermentable en rumen puede disminuir la concentración de N-NH₃ ruminal y que esto se produciría a través de una mejoría en la captura del N-NH₃ destinado a la síntesis de PM, entre otras causas. Esto fue demostrado en estudios *in vivo*, tras la inyección intraruminal de mezclas de CH (Hristov et al., 2005) o tras la inyección de glucosa y almidón (Oba y Allen, 2003), detectándose la disminución de la concentración de N-NH₃. Idéntico resultado se obtuvo, *in vitro*, adicionando CH a las incubaciones (Hristov et al., 1997).

Merry et al. (2006), trabajando con bovinos alimentados con dietas que diferían en el contenido de azúcares solubles, también observó una menor concentración de N-NH₃ en el líquido ruminal de los animales que consumían dietas con un alto contenido en estos compuestos.

Sin embargo, en otros trabajos, con animales consumiendo dietas que variaban la composición de CH, una con un alto contenido de CH no estructurales (CHNE), y otra con un alto contenido de CH estructurales (CHE), la concentración de N-NH₃ fue más baja en los animales que consumieron la dieta con un alto contenido CHE (Hristov y Ropp, 2003). Según estos autores, esto se debió a que la dieta con un alto contenido de CHE estimuló el crecimiento de las bacterias celulolíticas y, como el N-NH₃ es la única fuente de nitrógeno de estas bacterias, la concentración en el rumen de éste fue menor que con la dieta rica en CHNE. Ésta hipótesis podría explicar los resultados obtenidos en este experimento, ya que también se observó una concentración más baja de N-NH₃ en los animales que consumieron la dieta con menor contenido de CHNE.

Se ha observado una disminución en la actividad de las bacterias celulolíticas cuando el pH desciende por debajo de 6 (Hoover, 1986; Shriver et al., 1986; Russell y Wilson, 1996). Esto trae como consecuencia un descenso en la concentración ruminal del N-NH₃. A su vez, el pH ácido puede actuar disminuyendo el número de algunas cepas bacterianas capaces de degradar péptidos y desaminar aminoácidos, reflejándose en menores concentraciones de N-NH₃ y bajos recuentos de colonias proteolíticas, como demostraron los trabajos *in vitro* de Erfle et al. (1981). En el presente trabajo se observó un menor pH medio durante M, incluso a la hora 5 se dió el menor valor de todo el ensayo (5,48) y está por debajo de 6 durante 4 horas, lo cual también podría explicar la menor concentración de N-NH₃ durante ese tratamiento.

Los valores promedios del pH ruminal se encontraron dentro del rango de valores en que la mayoría de los microorganismos del rumen exhiben una óptima actividad y crecimiento (6,0 a 6,9) (Van Soest, 1994). Dichos valores coinciden con los obtenidos en otros trabajos con ruminantes a pastoreo (Cajarville et al., 2006; Aguerre M., 2010).

Sin embargo, la variación del pH observada durante el día fue importante. Según Sauviant et al. (1999), existe una relación negativa entre la velocidad de ingestión de los alimentos y el pH. Así, los animales que ingieren alimentos en poco tiempo tienen un pH ruminal inferior. En este caso, con animales alimentados en forma restringida, una sola vez al día y durante 4 horas, se observó que éste disminuyó luego de la ingesta. Esta disminución persistió aproximadamente hasta la hora 5 (M) y 2 (T) pos ingestión.

Si bien cabría esperar un menor pH ruminal en los animales que consumieron la pastura T, debido al aumento de AS de la misma, como encontró Pérez (2006) en corderos alimentados con pastura cortada y administrada por la tarde, esto no ocurrió, el pH fue significativamente menor en M.

La administración de CH, a través de la suplementación con granos a vacas lecheras a pastoreo, se ha relacionado con rápidas disminuciones en el pH ruminal (García et al., 2000). Sin embargo, otros trabajos, encontraron que el pH de vacas a pastoreo suplementadas con concentrados, no se vio afectado (Reis y Combs, 2000).

A su vez, en otros trabajos, como el realizado por Hristov y Ropp (2003), el pH ruminal fue más bajo en los animales que consumieron una dieta con alto contenido de CHE en comparación con los que consumieron una dieta con un alto contenido de CHNE, aunque no fue significativo. Penner et al. (2009), comparando los pH ruminales de animales alimentados con dietas ricas en azúcares y dietas bajas en azúcares, obtuvieron un pH mínimo diario más alto en los animales que eran alimentados con dietas ricas en azúcares (5,61 vs 5,42).

Como ya se mencionó, existe una relación negativa entre la velocidad de ingestión de los alimentos y el pH (Sauviant et al., 1999). En este sentido, los animales alimentados durante M pudieron haber comido más rápido que los alimentados en T y esto podría explicar los menores valores de pH obtenidos en M. Sin embargo, se considera que esta hipótesis es poco probable, dado que la ingesta total no fue diferente entre los tratamientos.

Por otra parte, los bajos valores de pH, que se mantienen por debajo de 6 desde la hora 4 a la 7 en M y desde la hora 2 hasta la 5 en T, se corresponden con aquellos que causarían una disminución de la actividad de las bacterias celulolíticas y un aumento de las amilolíticas (Santini y Elizalde, 1994). Por lo tanto, esto podría indicar que la actividad sobre los carbohidratos estructurales se vio afectada.

Por otra parte, el fenómeno que se observa cuando se comparan las medias de pH y N-NH₃ a lo largo de las 24 horas, sugiere que este tipo de pasturas contiene carbohidratos y materias nitrogenadas muy degradables y que lo hacen en forma simultánea.

En relación a la eficiencia de síntesis microbiana, en este trabajo fue superior al valor promedio propuesto por el ARC (1984), de 30 g N mo/Kg MODR y, al rango de 30-45 g N mo/kg MODR, propuesto para rumiantes consumiendo pasturas de buena calidad (Elizalde et al., 1998). Este hecho es indicativo de que se trata de un alimento de alta calidad.

En cuanto a la producción de PM, a pesar que las diferencias encontradas entre los tratamientos no fueron significativas, durante T tendió a aumentar la eliminación de N mo en la orina. Esto es lo que se esperaba, ya que al sincronizar aportes rápidos de N y energía en T, obtendríamos un aumento de la síntesis de proteína microbiana en rumen, y por lo tanto, un aumento del flujo de N mo hacia el duodeno.

Los resultados de producción de PM coinciden con los observados por García et al. (2000), que, trabajando con terneras y estudiando el efecto de la sincronización del aporte de N y E al rumen, tampoco observaron diferencias significativas. Sin embargo, no coinciden con los obtenidos en estudios *in vitro*, en los cuales se observó un aumento en la producción de proteína microbiana a medida que la cantidad de carbohidratos no estructurales en la dieta aumentó (Stokes et al. 1991).

La sincronización de N y E, según algunos autores, promueve un aumento de la producción y una mayor eficiencia en la síntesis de proteína microbiana (Herrera-Saldana et al., 1990; Kim et al., 1999). Sin embargo, otros ensayos muestran que el flujo de N mo al intestino delgado disminuyó con la adición de sucrosa (Sannes et al., 2002).

A su vez, Henning et al. (1993), comparando el efecto que tenía la infusión constante de hidratos de carbono en rumen con la infusión puntual cada 12 horas, observaron que la infusión constante de hidratos de carbono aumentó la eficacia de síntesis de proteína microbiana, pero el nivel de sincronización entre energía y proteína no tuvo ningún efecto sobre la eficacia de síntesis o el aporte total de proteína microbiana. Estos resultados indicarían, según Stern et al. (1994), que la disponibilidad constante de energía es más importante para el crecimiento microbiano que la sincronización de la fermentabilidad de la energía y la proteína, siempre y cuando el nitrógeno no sea un factor limitante.

Bach et al. (2005), plantean que el rumen es un entorno complejo, habitado por diferentes especies microbianas, cada una de ellas con diferentes necesidades nutricionales y diferentes metabolismos. Así, es probable que en el complejo ecosistema ruminal, cuando el suministro de nutrientes se sincroniza para una subpoblación microbiana, puede no estarlo para otras poblaciones, de tal forma que la eficiencia en la síntesis de proteína microbiana no se ve modificada.

9. CONCLUSIONES

La pastura cortada y administrada en la mañana provocó un menor pH y una menor concentración ruminal de N-NH₃ en las terneras. A su vez, los valores mínimos de pH fueron simultáneos con las máximas concentraciones de N-NH₃

La síntesis de proteína microbiana tendió a aumentar en las terneras alimentadas durante la tarde. Sin embargo, no se observó un aumento significativo en la eficiencia de síntesis microbiana de dichas las terneras.

Para ambos tratamientos se observaron valores de pH promedios superiores a los mínimos para la actividad celulolítica, altas concentraciones de N-NH₃ y altas eficiencias de síntesis de proteína microbiana.

10. BIBLIOGRAFÍA



1. Abarca, S., Ibrahim, M., Mannelje, L., 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. Agricultural and Food Research Council (1992). Nutritive requirements of ruminant animals: protein. Nutr Abstr Rev series B; 62: 787-835.
3. Aguerre, M. (2010). Suplementación con gran de sorgo a vaquillonas consumiendo una pastura templada: efecto sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y el metabolismo de la glucosa. Tesis de Maestría en nutrición de rumiantes. Universidad de la Republica, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay, 45 p.
4. Aguerre, M., Cajarville, C., Machado, V., Persak, G., Bambillasca, S., Repetto, J. L. (2009a). Dry matter intake and digestibility of temperate pastures supplemented with sorghum grain in wethers and heifers. South African J. Anim Sci.; 39 (Suppl 1): 251-255.
5. Aguerre, M., Cajarville, C., Kozloski, G. V., Repetto, J. L. (2009b). Ruminal microbial protein synthesis of wethers and heifers fed fresh temperate pastures supplemented or not with sorghum grain. XIth International Symposium on Ruminant Physiology. Clermont – Ferrand, France.
6. Antúnez, M., Caramelli, A. (2009). Variación en la composición química y producción de gas *in vitro* de pasturas de acuerdo al horario de corte. Tesis de grado. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. 43 p.
7. Association of Official Agricultural Chemists (1984). Official Methods of analysis. 14a ed. Assoc. Of Official Agricultural Chemists. Arlington, U.S, 1141 p.
8. 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, Commonwealth Agric Bureaux, 351 p.
9. Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. J. Dairy Sci.; 88: (E. Suppl.): E9–E21.
10. Britos, A., Repetto, J.L., Errandonea, N., Garciarena, D., Cajarville, C. (2006). Efecto del momento de corte y del proceso de ensilaje sobre la fermentescibilidad de forrajes templados: producción de gas *in vitro*. XIV Jornadas de Jovens Pesquisadores da Associação de Universidades Grupo Montevideo. 534 p.
11. 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.
12. Cabrita, A. R. J., Dewhurst, R. J., Fernandes Abreu, J. M., Fonseca, A. J. M. (2006). Evaluation of the effects of synchronising the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows – a review. Anim. Res.; 55: 1–24.
13. Cajarville, C., Aguerre, M., Repetto, J.L. (2006). Rumen pH, N-NH₃ concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. Anim. Res.; 55: 511–520.

14. Calsamiglia, S., Ferret, A. (2002). Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. XVIII curso de especialización FEDNA (Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal). Barcelona, España. p. 97 – 115.
15. Calsamiglia, S., Ferret, A. Devant, M. (2002). Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.*; 85:574–579.
16. Calsamiglia, S., Stern, M. D., Firkins, J. L. (1996). Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. *J. Anim Sci.*; 74: 1375-1381.
17. Carro, M. D. (2001). La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: comparación entre marcadores microbianos (Revisión). *Inv. Agr.: Prod San Anim.* 16 (1): 5-27.
18. Cerrato-Sánchez, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. (2007). Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:1486–1492.
19. Chalupa, W. (1968). Problems in feeding urea to ruminants. *J. Anim. Sci.*; 27: 207-219.
20. Chen, X. B., Gomes, M. J. (1995). Estimation of Microbial Protein Supply to Sheep and Cattle Based on Urinary Excretion of Purine Derivatives—An Overview of the Technical Details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen, UK. 21 p.
21. 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.
22. Erfle, 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.
23. 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.
24. 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.
25. Goad, D. W., Goad, C. L., Nagaraja, T. G. (1998). Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J Anim Sci.*; 76:234-241.
26. Goering, H.K., Van Soest, P.J. (1970). Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agric. Handbook 379, USDA.* 20 p.
27. 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.
28. 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.

29. 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.
30. 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 - 148.
31. Hoover, W. H. (1986). Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J Dairy Sci.*; 69: 2755-2766.
32. Hristov, A.N., Ropp, J.K., Grandeen, 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.
33. Hristov, A.N., Ropp, J.K. (2003). Effect of Dietary Carbohydrate Composition and Availability on Utilization of Ruminal Ammonia Nitrogen for Milk Protein Synthesis in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*; 86:2416–2427.
34. 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.
35. Huntington, G.B., Archibeque, S.L. (1999). Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* Disponible en: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0939.pdf>. Fecha de consulta: 8/01/2010.
36. 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.
37. Krause, M, Oetzel, G., (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review, *Anim Feed Sci Technol.*; 126, 215-236.
38. 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.
39. Lapierre, H., Lobley, G.E. (2001). Nitrogen recycling in the ruminant: A review. *J.Dairy Sci.*; 84 (E. Suppl.): E223-E236.
40. Martinez Marín, A. L. (2009). Urea de lenta degradación ruminal como sustituto de proteína vegetal en dietas para rumiantes. *Revista electrónica de Veterinaria*. Vol. 10, Nº 12, Diciembre. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121209/120906.pdf>. Fecha de consulta: 6/01/2010.
41. 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. Disponible en: http://alfalfa.ucdavis.edu/+symposium/proceedings/asdf/alf_symp/2005/05-223.pdf. Fecha de consulta: 10/06/2009.
42. Mehrez, A. Z., Ørskov, E. R., McDonald, I. (1977). Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br J Nutr* 38: 437-443.

43. Merry, R. J., Lee, M. R. F., Davies, D. R., Dewhurst, R. J, Moorby, J. M., Scollan, N. D., Theodorou, M. K. (2006). Effects of high-sugar ryegrass silage and mixtures with red clover silage on ruminant digestion. 1. In vitro and in vivo studies of nitrogen utilization. *J. Anim. Sci.* 84:3049–3060.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Orr, R. J., Penning, P. D., Harvey, A., Champion, R. A. (1997). Diurnal Patterns of intake rate by sheep grazing monocultures of ryegrass or white clover. *Anim Behav Sci.*; 52: 65–77.
48. Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J, Gill, D.R. (1998). Acidosis in cattle: a review. *J. Anim Sci.*; 76: 275-286.
49. Penner, G. B., Guan, L. L., Oba, M. (2009). Effects of feeding Fermenten on ruminal fermentation in lactating Holstein cows fed two dietary sugar concentrations. *J Dairy Sci.*; 92: 1725–1733.
50. Pérez, A., Repetto, J. L., Britos, A., Aguerre, M., Alonso, M., Gómez, X., Pérez, A. L., Cazzuli, G., Garín, D., Cajarville, C. (2006). Ruminal pH of lambs, heifers and cows fed temperate pastures depending on its time of cut. Oral presentation. 14° Simposio Internacional y 6° Conferencia Cojeras en Rumiantes. Colonia, Uruguay.
51. Pérez, A., (2006). pH, amoníaco, ácidos grasos volátiles y producción de proteína microbiana en el rumen de corderos, según el horario de corte de la pastura consumida. Tesis de grado. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay. p. 44.
52. Rearte, D.H., Santini, F.J., (1989). Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. *Rev Arg Prod Anim*; 9: 93 - 105.
53. Reis, R.B., Combs, D.K. (2000). Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. *J. Dairy Sci.* 83:2888–2898.
54. 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. Dairy Sci.* 89 (1): 102 (Abstract).
55. Repetto, J.L., Errandonea, N., Britos, A., Cozzolino, D., Cajarville, C., (2003a). Changes in water soluble carbohydrate contents during the day in Lucerna and Fescue cut in autumn. Proceedings of the British Society of Anim Sci, York, UK, p. 176.
56. 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.

57. 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, Noviembre 2001.
58. 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.
59. Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S., Manteca, X. (2006). Effects of nonstructural carbohydrates and protein sources on intake, apparent total tract digestibility, and ruminal metabolism in vivo and in vitro with high-concentrate beef cattle diets. *J. Anim Sci.*; 84:1188-1196.
60. Russell, J. B. (1996). US Dairy Forage Research Center. Informational Conference with dairy and forage industries. Disponible en: http://www.dfrc.wisc.edu/Research_Summaries/ind_meet/dfrc9.pdf Fecha de consulta: 8/1/2010.
61. 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.
62. Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., Sniffen, C. J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim Sci.*; 70: 3551-3561.
63. 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.
64. Santini, F. J., Elizalde, I. C. (1994). Digestión ruminal, aspectos conceptuales e implicancias practicas. *Crea, Suplementación de vacunos, Cuad. Act. Tec.* 53:10-16. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/90-digestion_ruminal.pdf Fecha de consulta: 05/06/10
65. Satter, L.D., Slyter, L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br J Nutr.*; 32: 199-208.
66. Sauvant, D., Meschy, F., Mertens, D. (1999). Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogenes des rations. *INRA. Prod. Anim.* 12:49-60.
67. 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.
68. Slyter, L. L. (1976). Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.*; 43: 910-929.
69. Smith, D. (1973). The nonstructural carbohydrates. En: Butler, G.W., Bailey, R.W. *Chemistry and Biochemistry of herbage.* New York. Academic Press. p. 105 – 155.
70. Sniffen, C.J.; Robinson, P.H. (1987). Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. *J. Dairy Sci.*; 70: 425-441.
71. Stern, M. S., Calsamiglia, S., Endres, M. I. (1994). Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. *X Curso de especialización Fedna. Madrid-España.* p. 177- 194.

72. Stokes, S. R.; Hoover, W. H.; Miller, T. K.; Blauweikel, R. (1991). Ruminal digestion and microbial utilization of diets varying in type of carbohydrate and protein. *J. Dairy Sci.*; 74: 871-881.
73. 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.
74. Valadares, R. F. D., Broderick, G. A., Valadares, S. C., Clayton, M. K. (1999). Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Anim Sci.*; 82: 2686-96.
75. Van Soest, P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2a. ed., Ithaca. Cornell University Press, 476 p.
76. Verbic, J, McLeod, X, Orskov, E. (1990). Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J. Agric Sci.*; 114, 243-248.
77. Yemm, E.W., Willis, A. J. (1954). The Estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57: 508 - 514.