



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE MICROORGANISMOS BIOLÓGICAMENTE
ACTIVOS Y UN ACTIVADOR DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL SOBRE
CONSUMO, CINÉTICA DE DIGESTIÓN Y VARIACIÓN DEL PH RUMINAL DE
VACAS HOLANDO CONSUMIENDO ENSILAJE DE SORGO**

por

Roxana FROIDEVAUX BUGANI °
Jimena GONZALEZ GUERRA °
Tanira PERES DE FIGUEREDO LEONARDI °



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

Modalidad: Ensayo Experimental

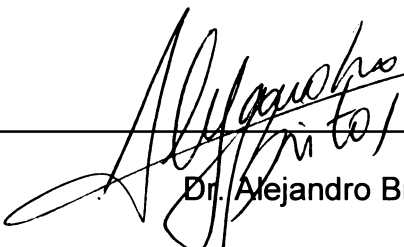


FV 29359

MONTEVIDEO
URUGUAY
2011


TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dr. Alejandro Britos

Segundo Miembro (Tutor):



Ing. Agr. (PhD) Pablo Chilibroste

Tercer Miembro:

Dr. Alvaro Nuñez

Co-tutor:



Ing. Agr. MSc. Alejandro Mendoza

Fecha:

23 de diciembre de 2011

Autores:



Br. Roxana Froidevaux Bugani



Br. Tanira Peres de Figueredo Leonardi

29359

2

RIA

Apr 11 (once) 2011

RIA

11 (once) 2011

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestros más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de alguna forma han hecho posible nuestra formación, especialmente:

A nuestro tutor Ing. Pablo Chilbroste por su dirección en la realización de este trabajo.

A nuestro cotutor Ing. Agr. Alejandro Mendoza por su colaboración.

A los amigos y compañeros que compartieron estos años de nuestras vidas.

A la Universidad de la República, Facultad de Veterinaria por darnos nuestra formación.

A los docentes de la Orientación Producción Animal (Paysandú) por ser no solo profesores sino también amigos.

A todos los funcionarios de la EEMAC por la ayuda en el período de trabajo de campo; gracias por hacernos sentir como en casa y pasar buenos momentos.

A todos los que colaboraron de una u otra forma para realizar este trabajo.

A ALUR S.A por el apoyo financiero.

El agradecimiento más especial va dirigido a nuestros padres, hermanos, tíos, abuelos, novios, familiares nuestros y prestados por estar siempre acompañándonos en todo momento de forma incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

Página

| | |
|---|----|
| APROBACIÓN | 2 |
| AGRADECIMIENTOS | 3 |
| LISTA DE CUADROS Y FIGURAS | 6 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 7 |
| RESUMEN | 8 |
| SUMMARY | 9 |
| INTRODUCCIÓN | 10 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| Degradación de los distintos alimentos..... | 11 |
| Fibra: composición y degradabilidad ruminal..... | 12 |
| Ensilaje..... | 13 |
| Valor nutritivo de los ensilajes..... | 13 |
| Sorgo..... | 14 |
| Ambiente Ruminal..... | 14 |
| Microorganismos vinculados en la digestión de la fibra..... | 15 |
| Influencia de diversos factores sobre los microorganismos del rumen..... | 16 |
| pH..... | 16 |
| Consumo..... | 18 |
| Efectos asociativos que pueden ocurrir al introducir un nuevo alimento a una dieta..... | 19 |
| Suplementación..... | 19 |
| Aditivos..... | 20 |
| HIPÓTESIS | 25 |
| OBJETIVOS | 25 |
| Objetivo general..... | 25 |
| Objetivos específicos..... | 25 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| Diseño y periodo experimental..... | 26 |
| Tratamientos..... | 26 |
| Alimentos..... | 26 |
| Localización..... | 27 |
| Animales e instalaciones..... | 27 |
| Manejo..... | 28 |
| Preparación y procedimientos de las muestras a incubar..... | 28 |
| Determinaciones..... | 29 |
| Consumo de ensilaje de sorgo, Actibiol® y MEBA..... | 29 |
| Degradabilidad <i>In Situ</i> de MS de ensilaje de sorgo..... | 29 |
| pH del líquido ruminal..... | 29 |
| Análisis químico de ensilaje de sorgo, Actibiol® y MEBA..... | 30 |
| Análisis estadístico..... | 30 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS | 31 |
| Consumo..... | 31 |
| Degradabilidad de la materia seca de ensilaje de sorgo..... | 31 |
| pH ruminal..... | 32 |
| DISCUSIÓN | 33 |
| Consumo..... | 33 |
| Degradabilidad ruminal | 34 |
| pH ruminal..... | 35 |
| CONCLUSIONES | 37 |
| BIBLIOGRAFÍA | 38 |

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Página

| | |
|--|----|
| Figura 1: Valor nutritivo de los alimentos y Producción animal | 11 |
| Figura 2: Relación entre el rendimiento y estado madurez del forraje, con su efecto en el consumo y digestibilidad..... | 13 |
| Figura 3: Relación entre la orientación de las fermentaciones y el pH de líquido del rumen..... | 17 |
| Cuadro 1: Composición química del ensilaje de sorgo en los distintos períodos | 26 |
| Cuadro 2: Composición química de Actibiol® en los distintos períodos | 27 |
| Cuadro 3: Composición química de MEBA en los distintos períodos..... | 27 |
| Cuadro 4: Cronograma de actividades..... | 30 |
| Cuadro 5: Consumo de MS de ensilaje de sorgo, Actibiol® y MEBA; y consumo de MS total para los diferentes tratamientos | 31 |
| Figura 4: Desaparición de MS según el tiempo de incubación..... | 31 |
| Cuadro 6: Parámetro de degradabilidad ruminal de la MS de ensilaje de sorgo para los tratamientos C; C+A; C+M | 32 |
| Figura 5: Variación de pH en función del tiempo..... | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: Ácidos grasos volátiles

CH: Carbohidratos

DFM: Alimentación directa con microorganismos

FAD: Fibra ácido detergente

FB: Fibra bruta

FND: Fibra neutro detergente

mo: Microorganismos

MO: Materia orgánica

MODR: Materia orgánica aparentemente degradada en rumen

MOF: Materia orgánica fermentada en rumen

MS: Materia seca

N: Nitrógeno

NH₃: Amoníaco

NNP: Nitrógeno no proteico

PC: Proteína cruda

PV: Peso vivo

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar, en vacas lecheras secas, el efecto de administrar un activador de la fermentación ruminal (concentrado energético-proteico: mezcla de melaza, puntina de arroz, harina de maíz, afrechillo de trigo, expeller de girasol, melaza, nitrógeno no proteico y sales minerales) o un producto biológicamente activo (Microorganismos Eficientes Beneficiosos y Activados, componentes: melaza, maíz molido, soja molida, nitrógeno no proteico, sales minerales, sulfato de amonio, yogurt y agua), sobre el consumo de ensilaje de sorgo (ofrecido como única fuente de fibra). También se evaluó el patrón de variación diaria de pH ruminal al agregar dichos aditivos, y la degradabilidad *in situ* de la MS del ensilaje de sorgo para los tratamientos. Se usaron 3 vacas secas del rodeo de la Estación Experimental "Mario A. Cassinoni", las que fueron asignadas a 3 tratamientos en un diseño experimental de cuadrado latino (3 tratamientos por 3 períodos), donde cada período constó de 21 días de adaptación seguido de 7 días de mediciones. Los tratamientos evaluados fueron: 1) Control: ensilaje de sorgo como único alimento más una fuente de vitaminas y minerales, 2) Control + Actibiol® (concentrado energético-proteico) a razón de 9 g.kg PV⁻¹ y 3) Control + MEBA (Microorganismos Eficientes Beneficiosos y Activados) a razón de 9 ml.kg PV⁻¹. Durante cada período de mediciones se determinó: consumo de ensilaje, variación de pH ruminal y degradabilidad *in situ* de la MS del ensilaje de sorgo. El consumo de MS de la dieta base no difirió entre tratamientos, si aumentó el consumo de MS total para el tratamiento con Actibiol®. La degradabilidad de la MS, no fue afectada por la adición de Actibiol® o MEBA. Se registró una variación significativa de pH ruminal a lo largo del día determinada por la ingestión de ensilaje de sorgo alcanzando valores mínimos a las 12 horas de su suministro. La suplementación con los productos mencionados, no modificó significativamente ni los valores medios de pH ruminal, ni su variación a lo largo del día.

SUMMARY



The objective of this work was to evaluate, in non-lactating dairy cows, the effect of administering an activator of rumen fermentation (protein-energy supplement: a mixture of molasses, broken rice kernel, corn meal, wheat bran, sunflower meal, molasses, non-protein nitrogen and mineral salts), or a biologically active product (Efficient and beneficial microorganisms activated, ingredients: molasses, ground corn, ground soybean, non-protein nitrogen, mineral salts, ammonium sulfate, yogurt and water), on the intake of sorghum silage (offered as the only source of fiber), the pattern of daily variation in ruminal pH, and in situ degradability of sorghum silage. Three non-lactating dairy cows from the herd of the Experimental Station "Mario A Cassinoni", were assigned to three treatments according to a latin square experimental design (3 treatments x 3 periods), each period included 21 days of adaptation followed by 7 days of measurements. The treatments evaluated were: 1) Control: sorghum silage as the only food supplemented with vitamins and minerals, 2) Control + Actibiol[®] (protein-energy supplement) at a rate of 9 g .kg BW⁻¹ and 3) Control + MEBA (Efficient and beneficial microorganisms activated) at a rate of 9 ml.kg PV⁻¹. During each measurement period was determined: intake of silage, rumen pH variation, and in situ dry matter (DM) degradability of sorghum silage. The DM intake of basal diet did not differ between treatments, but total DM intake increased by the addition of Actibiol[®]. The ruminal degradability of DM was not altered by the addition of Actibiol[®] or MEBA. There was a change in rumen pH during the day due to sorghum silage intake, with minimum values reached at 12 hours after feed administration. However, supplementation with the above products did not significantly alter either the mean values of ruminal pH, or its variation throughout the day.

INTRODUCCIÓN:

En los sistemas de producción intensivos o semi-intensivos, los costos de alimentación representan una alta proporción del total de los costos de producción. Alimentar a los rumiantes con pasturas, contribuye a reducir dichos costos (Pérez, 2010). En Uruguay el 70% de la dieta del ganado lechero son las pasturas, henos y ensilajes, y el resto son concentrados a base de granos de cereales (Chilibroste *et al.*, 2003). Praderas y verdeos están sujetos a la estacionalidad en la producción, lo que se refleja en un crecimiento en la demanda de reservas (MGAP-DIEA, 2007). Dentro de los cultivos estivales destinados a reservas predomina el sorgo con 40.000 ha, de las cuales el 17,3% se destina a la elaboración de ensilaje de planta entera (MGAP-DIEA, 2007).

La optimización de la fermentación ruminal debe centrarse en la formulación correcta de raciones, y en un manejo adecuado de los programas de alimentación; sin embargo, es posible obtener beneficios adicionales mediante el uso de aditivos que modulen la fermentación ruminal (Calsamiglia *et al.*, 2005).

Existen una gran diversidad de suplementos energéticos, proteicos, y energéticos-proteicos que podrían ser utilizados en la alimentación de rumiantes a pastoreo, debiendo tener en cuenta la cantidad y calidad de la pastura ofrecida para adecuar el tipo y calidad de suplemento a las deficiencias de la misma (Pigurina, 1993). Dentro de las alternativas tenemos, el utilizado en este experimento registrado bajo la marca Actibiol[®], caracterizado por aportar energía y proteína en forma sincrónica a los microorganismos ruminales.

La utilización de probióticos en rumiantes provoca un aumento en el consumo voluntario aparente, una mayor digestibilidad de las paredes celulares de los forrajes, un incremento en el pH ruminal, una mayor concentración de amonio en el rumen y AGV, probablemente debido a una mayor cantidad de bacterias en los animales, lo que permitiría un mejor desempeño animal al mejorar el ambiente ruminal (y en consecuencia, los procesos digestivos) y no solamente por mejorar la calidad de los alimentos (Galina *et al.*, 2007; Elías y Herrera, 2008). En el presente estudio se utilizó un aditivo microbiano MEBA, compuesto de un pool de microorganismos como bacterias, levaduras y sus metabolitos, a los que se les ofrece las condiciones necesarias para su desarrollo a diferencia de los probióticos utilizados en la mayoría de los trabajos consultados en los que se trata de microorganismos aislados.

El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización del consumo y el ambiente ruminal de vacas lecheras fistuladas, en período seco, alimentadas con ensilaje de sorgo como único alimento, en combinación con un concentrado proteico energético (Actibiol[®]) ó Microorganismos Eficientes Beneficiosos y Activados (MEBA).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Degradación de los alimentos

Para el nutricionista las etapas básicas del racionamiento científico de los animales, son en primer lugar las determinaciones nutritivas y en segundo lugar la selección de los alimentos que cubran dichas necesidades (McDonald *et al.*, 2006). Pero, ¿qué pasa cuando ocurre lo inverso, cuando primeramente disponemos de ciertos alimentos para ofrecer y los mismos presentan baja digestibilidad no cubriendo las demandas nutritivas del animal?

La cantidad de nutrientes que un rumiante puede obtener de un forraje consumido a voluntad, depende de su ingestibilidad (cantidad de forraje consumida expresada en kilos de MS), y de su digestibilidad (proporción de este forraje que desaparece en el tubo digestivo) (McDonald *et al.*, 2006).

Existen factores que afectan la digestibilidad de los alimentos, clasificándose en factores animales, del alimento y del nivel de alimentación (Figura 1).

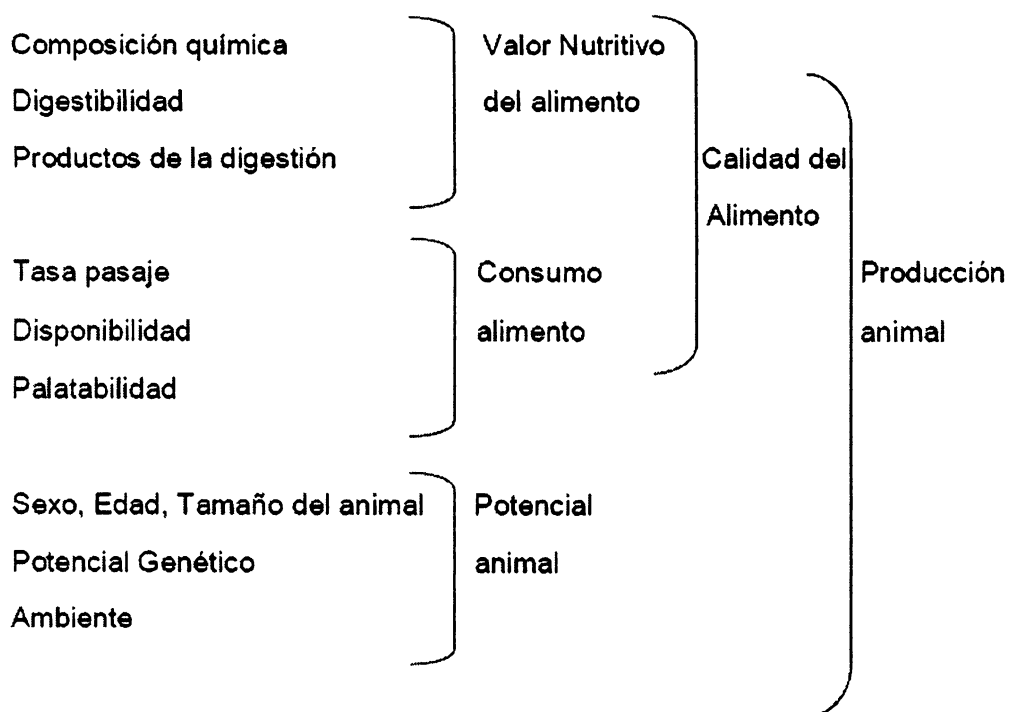


Figura 1: Valor nutritivo de los alimentos y Producción animal (Cozzolino, 1994).

Debido a la extensa fermentación bacteriana del rumen, los rumiantes son capaces de digerir celulosa y otros carbohidratos complejos, en forma más completa que los herbívoros no rumiantes (Maynard *et al.*, 1988).

De los componentes fibrosos de los alimentos, la lignina es resistente al ataque microbiano, la celulosa es más fácilmente desdoblada y la hemicelulosa es la más digestible de las tres. El almidón y los azúcares pronto son convertidos en ácidos y gases. La lignina no sólo es indigestible por sí misma, sino que disminuye la

digestibilidad de la celulosa y de otros carbohidratos complejos (Maynard *et al.*, 1988).

Fibra: composición y degradabilidad ruminal

Desde el punto de vista químico, la fibra se compone de un entramado de celulosa, hemicelulosa y lignina. En términos analíticos, se ha definido en FB (celulosa contaminada con cantidades variables de hemicelulosa, lignina y compuestos nitrogenados), FND (celulosa, hemicelulosa y lignina) y FAD (celulosa y lignina) y se utilizan para la predicción de la calidad de los forrajes, la ingestión de la MS, la digestibilidad y el valor energético de los alimentos. Desde el punto de vista de la nutrición de los rumiantes, la fibra puede definirse como el conjunto de componentes de los vegetales que tienen baja digestibilidad y promueven la rumia y el equilibrio ruminal (Calsamiglia, 1997)

La fracción CH de la pastura puede ser clasificada en 5 grandes fracciones: CH solubles en agua, pectinas, hemicelulosa, celulosa y lignina (Chilibroste, 1998). También se pueden clasificar en: de contenido celular (azúcares solubles de fácil digestión), de almacenamiento (o azúcar de reserva de las plantas, es el almidón también considerado de fácil digestión una vez abierto el grano) y estructurales (celulosa y hemicelulosa, constituyen las paredes celulares y corresponde a la fracción fibrosa de los alimentos, a estos se les asocia la lignina) (Regueiro y Van Lier, 2008). La estructura, como la cantidad y tipo de carbohidratos almacenados en el forraje, determinan su digestibilidad o disponibilidad para las bacterias ruminales (Arreaza *et al.*, 2005). La digestión ruminal de la celulosa y la hemicelulosa es muy variable dentro del día (Chilibroste, 1998).

Revisando el estado de maduración de la planta en términos generales, el contenido celular de las plantas jóvenes promedia el 65%, y la pared celular del 35%; para las plantas maduras la pared celular pasa a ocupar el 60%, mientras que el contenido celular disminuye al 40% (White y Wolf, 2009; López, 2009; Boschini y Amador, 2001; Bargo *et al.*, 2003).

El proceso de degradación de la fibra se inicia con la adhesión de las bacterias a la pared vegetal y progresa por la acción de las celulasas y hemicelulasas (Calsamiglia, 1997).

Las bacterias fibrolíticas producen glucosa o pentosas como productos intermedios, y utilizan mayoritariamente vías fermentativas que conducen a la producción de acetato como producto final. Durante el proceso fermentativo de la fibra se pierde un carbono en forma de metano, por lo que el proceso es energéticamente menos eficaz que la fermentación de otros nutrientes. La degradabilidad efectiva en el rumen, de la fibra potencialmente degradable, depende de la velocidad de tránsito ruminal y de su velocidad de degradación (Calsamiglia, 1997). La disponibilidad de energía a nivel de rumen puede ser muy distinta según la fuente de CH de que se trate, debido a las diferentes velocidades de fermentación (Repetto y Cajarville, 2009).

Los forrajes con altos tenores de FND y FAD, limitan el desempeño productivo al deprimir el consumo de MS a través de el efecto de llenado ruminal (Figura 2) (López, 2009; Bach y Calsamiglia, 2006).

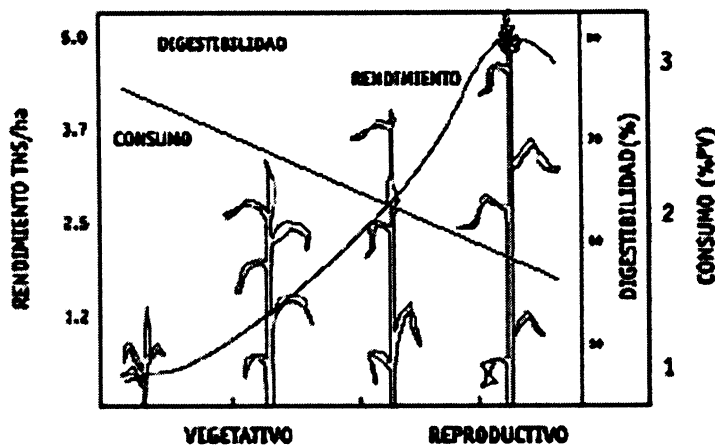


Figura 2: Relación entre el rendimiento y estado madurez del forraje, con su efecto en el consumo y la digestibilidad (Zanoniani *et al.*, 2003).

La fibra efectiva se define como la fibra con capacidad real de estimular la rumia y la salivación. La falta de fibra resulta en una depresión de la grasa en la leche, acidosis, laminitis y desplazamiento de abomaso, debido a desequilibrios físicos (falta de llenado ruminal) o fermentativos (reducción del pH ruminal) (Calsamiglia, 1997).

Ensilaje

El ensilado es el producto obtenido en la fermentación controlada de los cultivos de alto contenido en humedad. El proceso recibe el nombre de ensilaje y el continente silo. Los objetivos esenciales para conservar los cultivos por fermentación natural son: lograr condiciones anaerobias y evitar la actividad de mo indeseables. El pH crítico exacto al que tiene lugar la inhibición de los mo indeseables, varía con el contenido en MS y la capacidad tampón del cultivo ensilado (McDonald *et al.*, 2006).

Uruguay tiene una estacionalidad en la producción de forrajes, independientemente del tipo de especies con que se trabaje. Frente a la necesidad de estabilizar la oferta de alimentos y con ella la producción animal, las reservas forrajeras constituyen un eje fundamental en el sistema y en especial los silajes, cuya vida útil es prolongada en el tiempo (Abdelhadi, 2005; Mancuso *et al.*, 2002).

Valor nutritivo de los ensilajes

El valor nutritivo de los ensilados depende: de las especies vegetales, la fase de crecimiento en el momento de corte, (este determina el contenido de almidón, el ensilaje sin contener grano presenta menos de 50% de degradabilidad ruminal), los cambios que tengan lugar por la actividad de enzimas vegetales y mo durante la cosecha y el período de ensilaje (McDonald *et al.*, 2006; Di Marco, 2007; De León, 2004; Abdelhadi, 2005).

Young *et al.*, (1996) expresa que a medida que el contenido de grano en planta entera aumenta de 0 a 48%, el % de MS, MO y PC también aumenta y se reducen las concentraciones de FND y FAD.

El ensilaje puede integrar más de la mitad de la dieta de los animales en pastoreo, o ser la dieta base en la alimentación a corral cuando la proteína es externa (Abdelhadi, 2005). Si su contribución al total de la dieta supera el 35% de la MS total, puede afectar negativamente la producción individual por problemas de baja digestibilidad y tenor proteico (Mancuso *et al.*, 2002).

Los ensilados, necesitan una adecuada suplementación con CH fácilmente utilizables, para que los mo del rumen puedan enfrentarse a la rápida afluencia de amoníaco que sigue a la ingestión de ensilado (por ser el nitrógeno altamente degradable), y hacer máxima la síntesis de proteína microbiana y mínima la pérdida de nitrógeno y energía. En general la degradabilidad de la proteína de los ensilados es alta, encontrándose los valores entre 75-85% (McDonald *et al.*, 2006).

Sorgo

El término “sorgo” engloba a un conjunto de plantas pertenecientes todas ellas a la familia de las Gramíneas y al género *Sorghum*, entre las que cabe mencionar esencialmente a los sorgos para grano (*S. bicolor*) y a los Pastos del Sudán (*S. sudanense*), o a posibles híbridos intra o interespecíficos (Calsamiglia *et al.*, 2004). Está contemplado dentro de los forrajes (Ferret, 2003).

Teniendo en cuenta la cantidad de semilla importada en el año 2005 para la zafra agrícola 2005/06, la siembra agregada de sorgo en Uruguay (considerando todos los destinos grano seco, grano húmedo y ensilaje de planta entera) se habría ubicado entre 130 a 150 mil hectáreas, de las cuales 15.800 (DIEA 2006) se utilizaron para la cosecha del grano (maduro). El resto se habría destinado para ensilajes de planta entera y grano húmedo (Methol, 2006).

El sorgo es uno de los cultivos más utilizados debido a menor costo de implantación y/o producción; mayor tolerancia a la sequía, mayor recuperación a la misma y mayor producción de MS en estas condiciones (debido a su sistema radicular extenso, eficaz ritmo de transpiración, características foliares de las xerófitas, como la serosidad y la ausencia de pilosidad, que reducen la pérdida de agua de la planta); mayor adaptación a diferentes suelos con rendimientos también consistentes (Ribeiro *et al.*, 2007; Di Marco, 2007; Coria, 2010).

Ambiente ruminal

El rumen es un ecosistema que aloja numerosas especies microbianas, siendo las bacterias y los protozoos las más numerosas. Una población diversa estabilizará la fermentación, al evitar grandes fluctuaciones en las cantidades y proporciones de productos finales formados (Blanco, 1999).

La microbiota ruminal, proporciona al rumiante la oportunidad de digerir la fibra de los alimentos y es además la principal fuente de proteína de alta calidad (Repetto y Cajarville, 2009), ésta consiste en bacterias (10^{10} - 10^{11} células/ml, lo que representa más de 50 géneros), protozoos ciliados (10^4 - 10^6 /ml, más de 25 géneros), los hongos

anaeróbicos (10^3 - 10^5 zoosporas/ml, lo que representa 5 géneros) y los bacteriófagos (10^8 - 10^9 /ml) (Kamra, 2005; Yokoyama y Johnson, 1993).

Los mo se ubican en tres sitios diferentes en el rumen: adheridos a la pared (flora epimural), asociados a las partículas alimenticias (SAB), libres flotando en el líquido ruminal (LAB). La flora epimural hidroliza la urea y consume poco oxígeno, la SAB ataca sustratos no solubles, hidrófugos (bacterias celulíticas y hemicelulíticas), mientras que las LAB atacan sustratos solubles e hidrófilos (Regueiro y Van Lier, 2008)

La optimización en el crecimiento de la masa microbiana formada en rumen (importante por lo que representa como alimento en sí y como procesadora de fibras), implica dos conceptos: la producción microbiana, que se refiere a los g o kg de masa microbiana (o de N microbiano) formado en el rumen por día, y por otra parte la eficiencia de producción de proteína microbiana, esta se refiere a la cantidad de microorganismos generados por unidad de alimento. Se expresa de diferentes formas: masa microbiana (o N microbiano) en función de la MS ingerida, de la MO ingerida, o, de la MODR o MOF (Repetto y Cajarville, 2009).

La sinergia y el antagonismo entre los diferentes grupos de microbios e incluso entre diferentes géneros del mismo grupo, son tan diversos y complejos que es difícil cuantificar el papel desempeñado por los grupos particulares de microbios presentes en el rumen (Kamra, 2005).

Microorganismos vinculados en la digestión de la fibra

Las bacterias celulolíticas (fibrolíticas), desempeñan un papel irremplazable al atacar las paredes celulares intactas. Son estrictamente anaerobias y altamente sensibles a la acidez del contenido ruminal, de modo que su número se mantiene alto en dietas con predominio de forrajes (Regueiro y Van Lier, 2008) en las que el pH se establece en valores de 6,3-6,7, pero desciende muy sensiblemente en dietas ricas en concentrado con las que se alcancen niveles de pH inferiores a 6,0 (De Blas y García, 1993). Las bacterias celulolíticas colonizan la superficie de restos vegetales a los 5 minutos de entrada al rumen. Ante la existencia de amonio ellas se multiplican rápidamente como ocurre en el agregado de urea (Montalbetti, 2004).

Las bacterias del rumen son capaces de fermentar varios sustratos, por lo que se produce una superposición al incluirlas en grupos específicos (celulolíticas, aminolíticas, etc.) (Yokoyama y Johnson, 1993). En el rumen de animales alimentados con una dieta alta en fibra, predominan las bacterias Gram-negativas. El número de bacterias Gram-positivas tiende a aumentar con dietas ricas en energía (Kamra, 2005).

Los protozoos pueden representar el 2% del contenido del rumen, están en mayor número cuando los animales reciben dietas muy digestibles, son anaerobios estrictos. Los oligotricos, pueden ingerir partículas de alimento y pueden utilizar CH simples y complejos, incluyendo la celulosa. Los ciliados ingieren partículas de alimentos y atacan celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón, azúcares solubles y lípidos. (Yokoyama y Johnson, 1993; De Blas y García, 1993). El beneficio de los protozoos radica en controlar el nivel de sustratos disponibles y en consecuencia,

mantener una fermentación más uniforme (Yokoyama y Johnson, 1993). En el caso de dietas con elevado contenido de CH fácilmente fermentables, los protozoos contribuyen al ingerir rápidamente los gránulos de almidón y metabolizar el ácido láctico (reduciendo la caída de pH ruminal) (De Blas y García, 1993).

De Blas y García (1993) y Yokoyama y Johnson (1993), estimaron en más de un 8% la contribución de los hongos a la biomasa microbiana ruminal, cuando los animales reciben dietas ricas en forrajes. En términos cuantitativos, se ha demostrado que en ausencia de hongos la digestión "*in vitro*" de la paja disminuye (53,8% vs 44,6%) y se eleva la relación propiónico/acetato en el fluido ruminal (De Blas y García, 1993). Son capaces de degradar la celulosa y la hemicelulosa, presentando la ventaja de poder penetrar las paredes celulares lignificadas permitiendo el posterior acceso a las enzimas bacterianas (De Blas y García, 1993; Kamra, 2005).

Influencia de diversos factores sobre los microorganismos del rumen y simbiosis ruminal

La población microbiana del rumen no se mantiene estática, más bien se encuentra siempre cambiando a lo largo del día, las variaciones son influenciadas especialmente por el régimen alimenticio, así como tipo de dieta y su forma física, consumo de agua y frecuencia de distribución del pienso. El cambio de dieta impone al animal un período de transición en la población microbiana del rumen, donde las proporciones de las distintas especies cambiarán hacia un nuevo equilibrio. La adaptación puede tardar en producirse varios días o semanas, dependiendo de la intensidad del cambio experimentado por la dieta (Yokoyama y Johnson, 1993).

Los mo del rumen mantienen una relación simbiótica verdadera con el huésped (Owens y Goetsch, 1993). No todos los compuestos que son nutrientes para el rumiante, lo son para los microorganismos. La MO utilizable por los mo tiene capacidad de ser fermentada en el rumen: MOF integrada por las paredes celulares degradables, el almidón, la proteína degradable en rumen, y los azúcares (Repetto y Cajarville, 2009).

El rumen ofrece un ambiente favorable al desarrollo continuo de la población microbiana, actuando como cámara de fermentación. El mismo les brinda las siguientes condiciones: temperatura entre 38 a 42 °C (media de 39°C), anaerobiosis, pH entre 5,5 a 7,0 (promedio de 6,8), suplemento de nutrientes y continua renovación de la digesta y de los productos de la fermentación, MS que oscila entre 10 a 15%, gravedad específica entre 1,022 y 1,055, tensión superficial del líquido de 50 dinas/cm y presión osmótica constante (Silva de Oliveira *et al.*, 2007).

pH

La pieza central del control del equilibrio ruminal es el pH, ya que de éste depende, directa o indirectamente, el equilibrio de la microflora ruminal (Calsamiglia, 1997). Un pH ruminal bajo puede disminuir la MS, la digestibilidad de la fibra, y la producción microbiana (Allen, 1997).

El pH óptimo para el crecimiento de las bacterias del rumen se encuentra entre 6,0 y 6,9 para animales que consumen dietas ricas en forrajes (Kamra, 2005), esto es

confirmado por Abdelhadi *et al.* (2000) y Calsamiglia (1997), quienes sostienen que valores por debajo de 6,2 y 6,0 respectivamente, deprimen la actividad celulolítica (Figura 3). Así las principales especies bacterianas degradadoras de fibra como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens* son particularmente sensibles a pH bajo, y si el pH del rumen sigue cayendo, los lactobacilos pueden reemplazar *Streptococcus bovis*, iniciando un efecto en espiral con la acumulación de lactato excesivo que causa acidosis metabólica (Chaucheyras *et al.*, 2008). Un pH < 6 implica también el descenso del consumo de materia seca y la disminución de la relación (acético + butírico) / propiónico (De Blas *et al.*, 1995). Sánchez *et al.* (2007) sostienen que las bacterias ruminales son resistentes a cortos períodos de pH ruminal sub óptimo, aunque aún no está claro de cuánto es este tiempo.

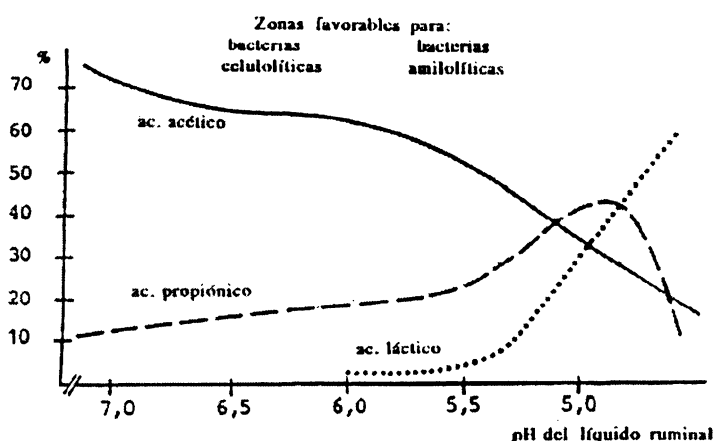


Figura 3: Relación entre la orientación de las fermentaciones y el pH de líquido del rumen (De Blas *et al.*, 1995).

El balance entre las cantidades de ácidos y bases producidas, la velocidad con que ocurre esa producción, y la eficiencia de absorción de los mismos, forman la base del pH del rumen (Church, 1993; Calsamiglia, 1997). Por un lado tenemos producción de una base como el NH_3 relacionada a la fermentación proteica, mientras que por otro lado tenemos la producción de ácidos como los AGV, resultantes de la fermentación de CH.

La dieta afecta el pH ruminal por diferentes vías. El forraje fibroso estimula la rumia mientras que los concentrados prácticamente no lo hacen. Durante la rumia se secreta gran cantidad de saliva, que contiene bicarbonato y fosfato que le dan un pH alcalino (8.2 a 8.4) y que en el rumen actúan como tampón frente a la producción de ácidos. En bovinos de alto consumo, la secreción puede superar los 100 litros diarios (Regueiro y Van Lier, 2008; Church, 1993). Los CH de fácil digestión, llevan a una producción más rápida de AGV acompañada por una baja producción de saliva, lo cual hace descender el pH ruminal. Recién cuando se fermentó la mayor parte de los CH de fácil digestión y el pH sube, se reanuda la degradación de la celulosa (Regueiro y Van Lier, 2008). Otro mecanismo para regular el pH ruminal es la absorción de los AGV por las paredes del rumen, lo cual tiene un efecto doble: elimina ácidos y agrega bases. La eructación elimina CO_2 , se capta H^+ para formar CO_2 y H_2O , reduciendo la acidez del medio (Regueiro y Van Lier, 2008). Estos

mecanismos se complementan, y cuando se alimenta al rumiante adecuadamente son suficientes para mantener el pH ruminal.

En cuanto a la distribución de las comidas en los sistemas de estabulación donde se ofrece el alimento fibroso picado y mezclado con el concentrado, la variación diaria de pH ruminal está asociada al patrón de ingestión y a los períodos de rumia de las vacas durante el día (Scandolo *et al.*, 2007; Regueiro y Van Lier, 2008). El pH disminuye más, si se administra el pienso en una o dos comidas diarias, que si se distribuyese en más tomas (Calsamiglia, 1997). Observando los patrones de variación diurna en el pH ruminal, el mismo disminuye poco después de comer, luego de lo cual aumenta gradualmente y regresa a un pH normal (> 6,0) durante la noche (Rustomo *et al.*, 2006).

Consumo

La producción animal puede ser mejorada mediante el aumento del consumo de alimentos, o logrando que sean más eficientes la digestión y el metabolismo (Grovm, 1993).

La señal de saciedad para dietas en base a forraje de calidad moderada, sería una distensión del retículo y del saco craneal del rumen. También influye la osmolaridad, H⁺, y AGV (principalmente el ácido acético) en la digesta del retículo-rumen, el contenido en ácido propiónico en las venas ruminales o del hígado y las hormonas tales como la insulina, glucagón, gastrina y colecistoquinina (Grovm, 1993).

Si se reduce el tránsito, consecuentemente disminuirá la ingestión diaria. Generalmente, se considera que la ingestión está limitada por la capacidad del rumen, y que los receptores de la repleción y tensión de las paredes del rumen señalan el grado de llenado al cerebro. Existe el concepto de que el llenado del rumen, está vinculado a mantener una cantidad constante de MS en el mismo, pero, existen alimentos como algunos tipos de ensilados, que no promueven un grado de repleción de MS tan grande como otros. Las deficiencias nutritivas que reducen la actividad de los mo del rumen, pueden reducir el consumo de alimentos (McDonald *et al.*, 2006).

En el caso de los ensilados las característica que pueden afectar el consumo de MS son: pH, capacidad tampón, lactato (g/kg MS), acetato (g/kg MS), butirato (g/kg MS), nitrógeno amoniacal (g/kg NT), MODR (g/kg MS), ritmo de digestión, fibra (g/kg MS). Se admite generalmente que la MS, la MODR y el nitrógeno amoniacal, son los principales (McDonald *et al.*, 2006).

La capacidad del rumen es un factor crítico para el consumo de alimentos, así a medida que los rumiantes crecen, la ingestión de alimentos sigue la proporcionalidad con el peso metabólico (PV^{0,75}). Si los animales están demasiados engrasados tienden a estabilizarse. Esto puede deberse a una limitación física o a un efecto metabólico (limitación lipostática). En las hembras gestantes, la ingestión es afectada por la mayor necesidad de nutrientes para el desarrollo del feto, pero en las últimas fases de la gestación se reduce la capacidad abdominal. Existe un aumento en la ingestión de alimento al inicio de la lactación (McDonald *et al.*, 2006).

En rumiantes en pastoreo la ingestión está afectada por la composición química, digestibilidad, estructura física y distribución del pasto. La ingestión viene determinada por el tamaño del bocado, el ritmo de consumo y la duración del pastoreo. En cuanto a la temperatura ambiente, si es inferior a la zona termoneutra, la ingestión aumenta, en tanto que si es superior, el consumo se reduce. (Mc Donald *et al.*, 2006; Cañas y Aguilar, 1992; Chilbroste, 1998).

Efectos asociativos que pueden ocurrir al introducir un nuevo alimento a una dieta

Adición: ocurre cuando la cantidad de nutrientes que el animal obtiene del forraje base es reducida, debido ésto a una baja digestibilidad, baja oferta forrajera ó reducido tiempo de pastoreo. En estos casos la suplementación completa la ración diaria y se produce un efecto de adición, aumenta el consumo total. Sustitución: a medida que aumenta la calidad del forraje el animal deja de consumir parte del forraje base para comer el suplemento. La reducción en el consumo de forraje al aumentar el consumo de suplemento se define como la tasa de sustitución. Adición y sustitución: es la combinación de los dos efectos anteriores, en la cual hay una mejora en la provisión de nutrientes, con una disminución no proporcional en el consumo del forraje base. Adición con estímulo: se da en animales consumiendo pasturas de muy baja calidad, una suplementación que mejore el funcionamiento ruminal produce un incremento en el consumo de forraje. Sustitución con depresión: ocurre cuando al suplementar se produce una disminución de la digestión del forraje base (Coria, 2010; Aguerre, 2010; López, 2009).

Suplementación

La suplementación tiene como premisa cubrir las diferencias entre los aportes del alimento base y las necesidades del animal, sin afectar el consumo de la dieta base. La suplementación estratégica como tecnología, tiene como objeto fundamental el suministrar los complementos nutricionales, en el momento, cantidad y calidad en que se requiera, así como a la categoría a suplementar. Es una estrategia, que además de nutricionalmente completa, debe ser económicamente satisfactoria (Herrera *et al.*, 2006).

En la nutrición de rumiantes "sincronía nutricional" se refiere a la provisión de proteínas (fuentes de N, proteína verdadera) y energía (CH) de tal manera que estén disponibles de forma simultánea en las proporciones requeridas para ser utilizados por los mo del rumen (Hall y Huntington, 2008; Calsamiglia, 1997). Al ocurrir una deficiencia proteica, el animal se siente "lleno", la fermentación ruminal es lenta y el rumen se mantiene con exceso de fibra, enviando señales de saciedad aunque el animal puede estar con déficit energético (Lauric *et al.*, 2009).

La suplementación estratégica con concentrado proteico-energético (administrando 0, 3, 6 ó 9 g por Kg PV) en la dieta de terneros consumiendo "Pasto estrella" (*Cynodon nlemfuensis*), favoreció el aumento de la digestibilidad de la MS en los diferentes tiempos de incubación. Los tratamientos con 6 y 9 g/Kg PV⁻¹ de concentrado expresaron mayor ($P < 0,05$) degradabilidad que el tratamiento con 3 g/Kg PV⁻¹ y el control a las 24 h hasta las 72 h. Se constató que el aumento del concentrado en la dieta provocó un incremento de 1,7 a 3,0% h⁻¹ de la tasa de

degradación. Los valores de la fracción insoluble pero potencialmente degradable, y de la degradación potencial fueron similares entre tratamientos. En cuanto al pH los tratamientos con 6 y 9 g Kg PV⁻¹ presentaron valores inferiores (P<0,01) que el tratamiento control (López, 2009).

Bargo *et al.*, (2003), observaron que en vacas lecheras la suplementación no afectó la digestión *in situ* de los forrajes, a excepción de una reducción en la tasa de degradación cuando se administraron grandes cantidades de concentrado. La suplementación con concentrados ricos en energía redujo la digestibilidad de la FND, mientras que sólo los suplementos de proteína aumentaron la digestibilidad de la FDN. La suplementación produjo un aumento total en la ingestión de MS del 24%, y una reducción del pH ruminal de 0,08 unidades cuando se elevó la cantidad de concentrado hasta 10 kg de MS/día, en comparación con los animales que recibieron forraje como única dieta.

Estudios realizados destacan que la suplementación proteico energética en terneros alimentados con forraje con 7% de PC, incrementó la digestibilidad de la MS, la energía y el N en un 65, 68 y 62% respectivamente, y sugieren que este efecto está motivado por la acción de la síntesis de proteína microbiana, dada por la sincronización energía-proteína, lo que aumentaría la actividad celulolítica y la biomasa bacteriana (López, 2009).

En la utilización de un suplemento que contenía de 72 a 78% de melaza, y 75% de NNP, se observó que los animales que recibieron suplementos, ganaron más del doble del PV respecto de los que no recibieron, siendo el pasto que consumieron de mala calidad (\pm 5% de PC) (Elías y Herrera, 2008).

Koza *et al.* (2004) evaluaron la influencia de distintos niveles de semilla de algodón (con alto contenido energético), sobre el consumo en novillos con una dieta base de "pasto estrella", se observó que la suplementación provocó el aumento del consumo total y porcentual (%PV) de MS.

Vinhas *et al.* (2002) evaluaron el pH ruminal en novillos consumiendo *Cynodon dactylon*, a los cuales se les suministró crecientes cantidades de concentrado (20, 40, 60 y 80%) el mismo fue balanceado de acuerdo con el NRC, isoproteico (15% de PC), se vio en el pH ruminal una lenta disminución, relacionada con el aumento del tiempo de muestreo. El valor mínimo de pH fue de 6,22, estimado con 43,86% de concentrado y 10,72 horas post alimentación. Se observó que todos los valores estuvieron siempre por encima de 6,0.

Un estudio llevado a cabo en corderos que estaban consumiendo una dieta en base a forraje de baja calidad (5% de PC), se les aplicó dos tratamientos suplementando con proteínas degradables y no degradables en rumen, se observó mayor consumo de MS a mayor frecuencia en la suplementación (Bohnert *et al.*, 2002).

Aditivos

La adición a la dieta del rumiante de diversos compuestos moduladores de la fermentación ruminal, genera modificaciones de los procesos digestivos y metabólicos del animal, aumentando la eficiencia de utilización de los alimentos al

augmentar la degradación de la fibra y el almidón, y la producción de AGV, estimulando la producción de propionato, inhibiendo la producción de metano, controlando la concentración de lactato y del pH ruminal, entre otros (Calsamiglia *et al.*, 2005; Pérez, 2010; Carro y Ranilla, 2002).

En base a los aditivos como moduladores de la fermentación ruminal, Calsamiglia *et al.*, (2005) hablan de clasificarlos en 2 grupos: los aditivos que estimulan el crecimiento de grupos bacterianos específicos (como los aditivos microbianos y los ácidos orgánicos), y por otra parte los aditivos que inhiben el crecimiento de grupos bacterianos específicos (como los extractos de plantas y los anticuerpos policlonales).

Existe a nivel mundial una demanda real por aditivos alimentarios alternativos a los antibióticos, ya que la resistencia a éstos de bacterias patógenas para el humano y los efectos residuales en los alimentos, a conducido a la prohibición de su uso en algunos países desde el año 2006 (Pérez, 2010 y Calsamiglia *et al.*, 2005). A diferencia del término probiótico (para la vida), antibiótico significa contra la vida, y su acción en los mo es inmediata. Sin embargo, el efecto de los probióticos no es inmediato, pero sí por un período más prolongado. Otra diferencia es que los probióticos son inmunoestimulantes y los antibióticos, inmunodepresores (García *et al.*, 2005).

Actualmente, la mayoría de los autores coinciden en definir a los probióticos como aditivos alimentarios formados por microorganismos vivos, que tienen un efecto beneficioso en la salud del hospedero (García *et al.*, 2005; Mc Donald *et al.*, 2006). Caja *et al.*, (2003) los define con un concepto más amplio, como cultivos simples o mezclados de mo vivos, que aplicados a los animales o al hombre en una dosis suficiente, benefician al hospedador mejorando las propiedades de la microflora intestinal original. En Estados Unidos se utiliza un término más genérico, "direct feed microbials" (DFM), para describir a estos aditivos alimentarios microbianos (Pérez, 2010).

Entre los microorganismos más utilizados para estos fines se encuentran las bacterias ácido lácticas, especialmente *Lactobacillus* sp y *Bifidobacterium* sp, y las levaduras, fundamentalmente las del género *Saccharomyces* (García *et al.*, 2005) también hongos, por ejemplo del género *Aspergillus* (Calsamiglia *et al.*, 2005).

Los Microorganismos Eficientes Benéficos y Activados se encuentran en diferentes nichos naturales o se cultivan como inóculos, que pueden actuar solos o en sinergismo, formando parte de una comunidad de bacterias, levaduras u hongos o mezclas de ellos, con un poder metabiótico beneficioso, capaces de modificar al medio en que se establecen o desarrollan y cuyos metabolitos pueden ser utilizados por plantas, animales, humanos, tratamientos de residuales de la agroindustria y otros. Solamente se consideran como miembros aquellos que comúnmente se encuentran de forma natural o que han sido aislados de ese nicho y no aquellos que han sido transformados genéticamente. Los miembros de este consorcio pueden pertenecer a cualquier especie, género o familia, con la condición fundamental de que la velocidad de crecimiento sea rápida, no produzcan toxinas ni enfermedades y sean capaces de transformar de forma benéfica al medio en que se desarrollan. Para que se produzca el efecto ideal sobre la fermentación, sería necesario que

junto con éstos, se adicione la dosis necesaria de un concentrado proteico-energético, que no es más que los nutrientes necesarios para producir crecimiento acelerado del pool de microorganismos (Elías y Herrera, 2008).

La comparación de los resultados publicados en revistas científicas es compleja, porque los productos utilizados no son iguales ni tienen los mismos efectos en el metabolismo ruminal. Además, las dosis se expresan indistintamente en g/día o CFU/día (Calsamiglia *et al.*, 2005). Chaucheyras *et al.* (2008) agregan que las respuestas varían dependiendo de la cepa de levadura utilizada, la naturaleza de la dieta y el estado fisiológico del animal. Sólo 7 cepas de levaduras de más de 50 cepas analizadas, tuvieron la capacidad de estimular el crecimiento de bacterias benéficas para la digestión de la fibra en el rumen. Esto explica en parte, la variabilidad en las respuestas, ya que muchos estudios se han basado en suplementos de cultivos de levadura mal definidos y podrían haber utilizado cepas con actividad poco estimulante (Denev *et al.*, 2007).

Los suplementos de cultivo de levaduras, pueden incrementar la degradación de la fibra, lo que estimula la ingestión de alimentos y el aporte de energía, mejorando la producción sin mejorar la eficiencia de utilización de nutrientes (Calsamiglia *et al.*, 2005; Denev *et al.*, 2007). Williams *et al.* (1991) explican que los efectos de los cultivos de levaduras sobre el consumo dependen de la tasa de digestión de la fibra, la que está relacionada con la estructura físico-química de los forrajes y el tiempo de retención ruminal. Concluyen que la adición de levaduras no siempre aumenta el consumo, debido a que es poco probable de que éstas ataquen la estructura celular de los tejidos de la planta.

Las levaduras tienen capacidad para consumir oxígeno dentro del rumen, lo que mejora el crecimiento de la microbiota ruminal, en especial de aquellos mo que son más dependientes de la anaerobiosis, como los mo celulolíticos y consumidores de lactato (Mc Donald *et al.*, 2006; Callaway y Martin, 1997; Casamiglia *et al.*, 2005; Brydl *et al.*, 2005; Chaucheyras *et al.*, 2008).

Las levaduras y sus medios de cultivos pueden contener nutrientes (ácidos orgánicos, vitaminas del grupo B, enzimas, aminoácidos) que estimulan el metabolismo de bacterias que utilizan lactato lo que provoca un aumento del pH ruminal y concomitantemente de las bacterias celulolíticas (Calsamiglia *et al.*, 2005; Chaucheyras *et al.*, 2008; Callaway y Martin (1997). Cuando se han utilizado hidrolizados de levadura en vez de levaduras vivas, se han reportado estos resultados lo que se atribuye a que las enzimas responsables siguen activas en el hidrolizado.

La adición de *Saccharomyces cerevisiae* resulta en la reducción de la concentración de ácido láctico, provocando un incremento en el pH ruminal que favorece el crecimiento de las bacterias fibrolíticas, y resulta en un incremento en la digestión de la fibra y en la producción de AGV (Dawson *et al.*, 1990; Lila *et al.*, 2004; Chaucheyras *et al.*, 2008; Callaway y Martin, 1997; Galina *et al.*, 2007).

Yoon y Stern (1995) y Chaucheyras *et al.*, (2008) resumieron 12 estudios en animales en lactación en los que se suplementó con *S. cerevisiae* y observaron un incremento en la ingestión de MS (media de 0,32 kg). En el análisis de 110 artículos,

157 experimentos, y 376 tratamientos que tratan con suplementos de levadura en los rumiantes realizado por Desnoyers *et al.* (2009) se concluyó que los suplementos de levadura aumentaron la ingesta de MS (+0,44 g/kg de peso corporal). Williams *et al.* (1991) proporcionaron un cultivo de levaduras a vacas lecheras Holando, consumiendo una dieta en base a heno o fardo de paja de cebada de baja calidad, mezclados con concentrado a razón de 50/50 o 60/40, se vio que el consumo de MS de la dieta completa se incrementó en 1,2 kg/d cuando el cultivo de levadura se añadió. También Beharka *et al.* (1991) observaron un incremento en la ingestión de MS en terneros a los que se los suplementó con extracto de *Aspergillus oryzae*. Acedo *et al.* (1998) reportaron que en los trabajos donde se empleó suplementación con levaduras, se encontró un incremento de ingestión de MS del 2,5% lo que equivalía a 0,46 kg/día de ingestión extra.

El cultivo de levaduras estimula la tasa de degradación de los alimentos sólidos en el rumen en las primeras 6 a 8 h después de la comida (Denev *et al.*, 2007; Ando *et al.*, 2004). Callaway y Martin (1997) observó en un trabajo que la levadura podría acelerar la tasa, pero no el grado de la degradación de la celulosa. Yoon y Stern (1996) encontraron que la digestión de la fibra en el rumen fue similar para los tratamientos que para los controles, en un trabajo realizado en vacas Holstein consumiendo una mezcla de ensilaje de maíz, heno de alfalfa, maíz, cereales, harina de soja y vitaminas a las que se las suplemento con levaduras y cultivos de hongos, tampoco encontraron diferencias en el pH.

Denev *et al.*, (2007) reportaron que levaduras estimularon directamente los hongos ruminales, aumentando el número de protozoos ruminales y la digestión de la FND, en novillos alimentados con dietas a base de paja. También Doreau y Jouany (1998) estudiaron en vacas que consumían ensilaje de maíz y concentrado (a razón de 60/40) el efecto de suplementar con *S. cerevisiae*, y observaron un incremento en la degradabilidad ruminal *in situ* de la MS y de la FND, siendo el aumento de esta última de 26,3% a 32,5%. Otro estudio en que a 5 vacas no preñadas y no lactando se les fueron asignadas 6 dietas con 0, 1, 2, 3, 4, y 6 gr de un extracto de fermentación de *Aspergillus oryzae*, se encontró que la digestibilidad de la PC, la FAD y la FND no difirió entre los tratamientos ($P > 0.05$) (Oellermann *et al.*, 1990).

La suplementación de levaduras vivas (*S. cerevisiae*) aumentó el pH del rumen entre 0,3 y 0,5 unidades, en vacas lecheras secas. Además, se describió un cambio en el comportamiento alimentario de las vacas, el cual presentó un menor intervalo entre las comidas (3,32 h), en comparación con las no suplementadas (4,32 h). Lo que sugiere que este cambio en la conducta de alimentación, también puede ser responsable de los cambios en el pH ruminal (Chaucheyras *et al.*, 2008).

Dawson *et al.* (1990) analizaron el efecto de suplementar novillos con dos suplementos microbianos conteniendo *S. cerevisiae* y lactobacilos, y observaron que el pH tiende a ser mayor ($P = 0,13$) en los animales que reciben los mo (6,50 vs 6,36). La concentración de mo celulolíticos en el rumen de los novillos que recibieron suplemento, conteniendo solamente levaduras, era de 5 a 40 veces mayores que los observados en los animales no suplementados. Desnoyers *et al.* (2009) evidenciaron un incremento en el pH ruminal de +0,03 en promedio, en una revisión de trabajos en los que se suplementó con levadura. Dicho efecto positivo aumentó con el porcentaje de concentrado en la dieta y con el aumento en el

consumo de MS y se correlacionó negativamente, con el nivel de fibra detergente neutra (FDN).

Nocek *et al.* (2002) evaluaron el efecto de la alimentación directa con microorganismos (DFM) en distintas cantidades en los perfiles diurnos de pH ruminal y en la digestibilidad *in situ*, utilizando nueve vacas. Las vacas alimentadas específicamente con 10^5 ufc/ml, fueron capaces de mantener un pH más alto y mayor digestión de la MS que los demás tratamientos. Beharka *et al.* (1991) observaron que al suplementar con *Aspergillus oryzae*, el pH ruminal se mantenía estable a pesar de ocurrir un aumento en la concentración de los AGV, atribuyendo esto a un aumento en la producción de saliva, por el aumento en el consumo de MS.

No existe un aditivo universal que modifique la fermentación ruminal para optimizar la eficiencia de utilización de la energía y la proteína, en parte porque sus efectos dependen del pH y del tipo de ración (Yoon y Stern, 1995). Ello es razonable si asumimos que ni las poblaciones microbianas en dichas condiciones (dietas forrajeras vs. dietas concentradas, pH alto vs pH bajo), ni los objetivos de la manipulación (vacuno de leche vs vacuno de carne) son iguales (Calsamiglia *et al.*, 2005).

HIPÓTESIS

La inclusión a una dieta a base de ensilaje de sorgo de Actibiol® (concentrado energético-proteico) o la inclusión de MEBA (Microorganismos Eficientes Beneficiosos y Activados) no altera el ambiente ruminal y aumenta la digestibilidad ruminal de la fibra.

La adición de Actibiol® o MEBA no provoca una caída en el pH ruminal que afecte negativamente la actividad de los microorganismos celulolíticos.

El uso de Actibiol® no provoca un efecto de sustitución sobre el consumo de forraje. El uso de MEBA tampoco altera el ambiente ruminal, no perturbando el consumo de dieta base.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el consumo y el ambiente ruminal de vacas Holando, en período seco, alimentadas con ensilaje de sorgo como único alimento, en combinación con Actibiol® o MEBA.

Objetivos específicos

Evaluar el efecto de administrar Actibiol® o MEBA sobre:

- el consumo de ensilaje de sorgo
- el patrón de variación diaria de pH ruminal
- la degradabilidad *in situ* de la MS del ensilaje de sorgo

MATERIALES Y METODOS:

Diseño Experimental

Para el diseño experimental se utilizó un cuadrado latino de tres tratamientos por tres períodos. A los animales se les asignaron los tratamientos por medio de sorteo al inicio del experimento, rotando de tratamiento para los subsecuentes períodos. Cada período constó de 28 días, donde 21 días eran para la adaptación a las dietas, y 7 días para las determinaciones. El experimento tuvo una duración total de 84 días.

Tratamientos

Se aplicaron los siguientes tratamientos:

- Tratamiento C: Control (Ensilaje de sorgo como único alimento, vitaminas y minerales)
- Tratamiento C+A: Control + Actibiol[®] a razón de 9 g.kg PV⁻¹
- Tratamiento C+M: Control + MEBA a razón de 9 ml.kg PV⁻¹

Alimentos

La dieta base utilizada fue ensilaje de sorgo de planta entera micropicado, realizado en abril del año 2009 en la EEMAC. El mismo fue administrado *ad libitum* calculando no menos de 5% de rechazo. La composición química se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1: Composición química del ensilaje de sorgo en los distintos períodos

| | MS (%) | MO (%) | PC (%) | _a FDN _{mo} (%) | FDA _{mo} (%) |
|-----------|--------|--------|--------|------------------------------------|-----------------------|
| Período 1 | 30,88 | 91,71 | 8,93 | 45,38 | 26,54 |
| Período 2 | 33,57 | 92,44 | 8,84 | 42,2 | 24,61 |
| Período 3 | 34,12 | 92,15 | 9,5 | 43,99 | 25,32 |

MS(%): porcentaje de materia seca; MO(%): porcentaje de materia orgánica; P(%): porcentaje de proteína cruda; _aFDN_{mo} fibra detergente neutro corregida por cenizas con amilasa; FDA_{mo} fibra detergente ácida. Los resultados están expresados en porcentaje en base seca.

Por otra parte se suministró un activador de la fermentación ruminal (concentrado proteico-energético), elaborado por la empresa ALUR SA (Bella Unión, Uruguay) registrado bajo la marca Actibiol[®], compuesto por una mezcla de melaza, puntina de arroz, harina de maíz, afrechillo de trigo, expeller de girasol, urea y sales minerales (Cuadro 2).

Cuadro 2: Composición química de Actibiol® en los distintos períodos

| | MS (%) | MO (%) | PC (%) | aFDN _{mo} (%) | FDA _{mo} (%) |
|-----------|--------|--------|--------|------------------------|-----------------------|
| Período 1 | 92,18 | 95,08 | 26,21 | 21,31 | 8,96 |
| Período 2 | 91,77 | 95,77 | 29,27 | 17,81 | 7,07 |
| Período 3 | 91,77 | 95,51 | 40,86 | 20,95 | 7,99 |

MS(%): porcentaje de materia seca; MO(%): porcentaje de materia orgánica; P(%): porcentaje de proteína cruda; aFDN_{mo} fibra detergente neutro corregida por cenizas con amilasa; FDA_{mo}: fibra ácida detergente. Los resultados están expresados en porcentaje en base seca.

El MEBA se suministró en forma líquida y se preparó en tarrinas de 200 l. La mezcla se basó en melaza, maíz molido, soja molida, NNP, sales minerales, sulfato de amonio, yogur y agua. El yogur aporta lactobacilos y estreptococos mientras que los otros mo (levaduras y hongos) son aportados por los alimentos utilizados en la mezcla (Cuadro 3).

Cuadro 3: Composición química de MEBA en los distintos períodos

| | MS % | PC% |
|-----------|-------|-------|
| Período 1 | 11,25 | 32,21 |
| Período 2 | 8,04 | 44,51 |
| Período 3 | 5,49 | 49,30 |

MS(%): porcentaje de materia seca; PC(%): porcentaje de proteína cruda. Los resultados están expresados en porcentaje en base seca.

Localización

El trabajo se llevó a cabo en la Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni" (EEMAC) en el km 363 de la Ruta 3, Paysandú, Uruguay (32° 21' S y 58° 02' W). La zona es sub húmeda con una temperatura media anual de 17°C, con una precipitación anual de 1100 mm y se encuentra ubicada sobre suelos de tipo Brunosol (formación Fray Bentos).

Animales e instalaciones

Fueron utilizadas tres vacas secas de raza Holando, pertenecientes al rodeo lechero de dicha estación experimental, una de las vacas se encontraba en primer tercio de gestación y las demás no gestando. Las mismas estaban provistas de una fístula ruminal. También se utilizó una vaca suplente con las mismas características. Al inicio del experimento, los animales en promedio pesaban 487kg, con una CC de 2,6.

Los tratamientos sanitarios fueron los oficiales y de rutina en la EEMAC. Las vacas se fistularon y manejaron de acuerdo a los procedimientos aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), procedimiento realizado por el Dr. Fernando Nan el 22 de abril de 2009.

El secado de las vacas se llevó a cabo el 29 de Diciembre de 2009.

Se construyeron cuatro Bretes de alambrado eléctrico de 264 m², con un comedero para ensilaje, otro para Actibiol[®] (según el tratamiento) y otro para núcleo vitamínico, bebederos individuales y sombra natural.

Las determinaciones de MS, pH del silo y el procesamiento primario de muestras, se realizaron en el Laboratorio de Análisis Químico y Laboratorio de Pasturas de la EEMAC (Paysandú, Uruguay). Los análisis químicos (PC, C, MS, aFDN_{mo} y FAD_{mo}) de los alimentos se realizaron en el laboratorio de Nutrición Animal y Evaluación de Alimentos de la Facultad de Agronomía (Montevideo, Uruguay).

Manejo

Previo al comienzo del experimento se registró el peso y CC de las 4 vacas, y al final de cada período (28 días) se determinaron nuevamente.

Las vacas fueron alimentadas a las 8:00 a.m, ofreciéndoles el ensilaje en forma individual en comederos de madera y el Actibiol[®] por separado en tarrinas; el MEBA se suministró a través de la cánula ruminal (dando un cuarto de la cantidad diaria a las 8:00, otra a las 12:00, a las 16:00 y a las 20:00 h respectivamente). Los animales contaron con acceso libre al agua y al núcleo vitamínico. La oferta de ensilaje fue regulada en función del consumo, y los suplementos en función del peso vivo de los animales en cada período. Se pesó diariamente la oferta y el rechazo de ensilaje y Actibiol[®].

Preparación y procedimiento de las muestras a incubar

Las muestras de ensilaje de sorgo utilizadas para medir la degradabilidad, fueron previamente secadas en estufas de aire forzado de 60°C hasta peso constante. Luego fueron molidas en molinillo Willey con malla de 2 mm.

Para la degradabilidad ruminal se usaron bolsas confeccionadas en tela de serigrafía con 40 µm de tamaño de poro promedio, de 18*9 cm, las cuales fueron numeradas, lavadas, llevadas a estufa y secadas hasta peso constante a 60°C. Las bolsas fueron llenadas con aproximadamente 5 g de muestra, previamente se registró el peso de las bolsas vacías y posteriormente el peso de las bolsas más el contenido. Las bolsas fueron cerradas utilizando precintos en la parte superior.

Previo a la incubación, las bolsas con muestras se colocaron en otra más grande y de trama mayor (usada para frutas), la cual fue atada a un hilo de material plástico trenzado. Al hilo trenzado se le enlazó una pesa de 350-450 g (candado) para mantener las bolsas en el saco ventral. El largo total de piola y bolsa fue aproximadamente de 1.5-1.7 m libres.

Se incubó el ensilaje de sorgo utilizando 22 bolsitas por tratamiento (20 corresponden a los tiempos de incubación y 2 respaldos), también se colocaron 2 blancos (bolsas vacías que siguen el mismo procedimiento). Previamente se hizo un pre-mojado durante 15 min en agua destilada a 39°C con el objetivo de simular la salivación, al cabo de este tiempo (tiempo 0) se extrajeron las bolsas correspondientes al mismo, y se colocaron las demás a incubar, sacando las muestras de a 2 bolsitas en los siguientes tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 96

h. El material incubado fue inmediatamente sumergido en agua helada para detener la fermentación, escurrido y colocado a -20°C en el menor lapso de tiempo posible.

Luego de realizada la última extracción y congelado de la misma, se procedió a lavar con agua (45 l) tres veces durante 2 min, cambiando el agua entre cada lavado. Las bolsas se secaron en estufa de aire forzado a 60°C hasta peso constante.

DETERMINACIONES

Consumo de ensilaje de sorgo, Actibiol® y MEBA

La determinación de consumo se realizó pesando diariamente durante la semana de determinaciones, la materia fresca de los alimentos ofrecidos y rechazados para cada animal (previo a ofrecer la alimentación diaria), a excepción del MEBA que al ser administrado intraruminal no existía rechazo (Cuadro 4).

Durante la semana de determinaciones se tomaron 4 muestras de cada tratamiento ofrecido y rechazado, lo cual se realizó los días lunes, miércoles, viernes y domingo. Éstas formaron una muestra compuesta sobre la que se realizó las siguientes determinaciones: PC, MS, aFDN_{mo} (fibra detergente neutro corregida por cenizas con amilasa) y FDA (fibra detergente ácido). Cada muestra individual se conservó a 4 °C hasta el momento de elaborar la muestra compuesta. Adicionalmente en las muestras de ensilaje se determinó pH.

Degradabilidad *in situ* de MS de ensilaje de sorgo

Se realizó la degradabilidad *in situ* de ensilaje de sorgo en tres diferentes ambientes ruminales dados por los tres tratamientos. Las bolsitas incubadas se extrajeron en los tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h, pesándose el residuo, y en las muestras de éste se determinó MS (Cuadro 4).

El modelo que se utilizó para el ajuste de la cinética de degradación ruminal fue el descrito por Ørskov y McDonald (1979): $d = a + b(1 - e^{-c \cdot t})$, donde d (%) es el material desaparecido de la bolsa en el tiempo t, a(%) es la fracción soluble, b(%) es la fracción no soluble potencialmente degradable, c(%h⁻¹) es la tasa fraccional de degradación de b.

pH del líquido ruminal

La determinación del pH ruminal se llevó a cabo extrayendo 200 ml de líquido ruminal en los tiempos: 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, y 24 h a partir de administrado el ensilaje, durante 2 días consecutivos siendo éstos los 2 primeros días de la semana de determinaciones (Cuadro 4). La obtención del líquido ruminal se realizó mediante vacío con un dispositivo introducido a través de la cánula ruminal y ubicado en la región del saco ventral del rumen. Las muestras de líquido ruminal de 200 ml fueron filtradas a través de una tela doble de lienzo (quesería), siendo el pH determinado en forma inmediata con un pHmetro portátil marca Oakton (Acorn® pH 5 Meter, Vernon Hills, USA)

Análisis químicos de ensilaje de sorgo, Actibiol® y MEBA

El contenido de MS se determinó por secado de las muestras a 60°C y a 105°C. Para la PC, se cuantificó nitrógeno por macro-Kjeldahl y luego se convirtió a PC multiplicando por 6,25. Contenido en cenizas con Mufla a 600°C. Estas determinaciones fueron realizadas de acuerdo con los procedimientos de la AOAC (1990). La MO se calculó haciendo 100 menos el % de cenizas. Los contenidos de FND y FAD fueron determinados con tecnología Ankom de forma secuencial (Van Soest *et al.*, 1991). Los análisis químicos se expresaron en base MS. Para determinar el pH del ensilaje, se utilizó la técnica de Acidez total por método volumétrico.

Cuadro 4: Cronograma de actividades

| Días | Actividad | Período |
|------|-----------------------------------|---------|
| 21 | Adaptación a la dieta | 1 |
| 7 | Incubación y Colección Materiales | |
| | Medición de pH | |
| | Medición consumo | |
| 21 | Adaptación a la dieta | 2 |
| 7 | Incubación y Colección Materiales | |
| | Medición de pH | |
| | Medición consumo | |
| 21 | Adaptación a la dieta | 3 |
| 7 | Incubación y Colección Materiales | |
| | Medición de pH | |
| | Medición consumo | |

Análisis estadístico

El consumo y parámetros de degradabilidad de la MS de ensilaje de sorgo se analizaron con un modelo que incluyó el efecto del tratamiento, animal y período (PROC GLIN MIX; SAS, 9.1). Para consumo, la variable repetida fue día de muestreo dentro de cada combinación vaca*período. En todos los casos las medias se separaron con el Test de Tukey y se consideró como significativa una probabilidad menor a 0,05. Para degradabilidad luego que se utilizó el ajuste de la cinética de degradación ruminal descrito por Ørskov y McDonald (1979): $d = a + b(1 - e^{-c \cdot t})$, se les realizó un análisis de varianza de acuerdo a un cuadrado latino 3*3. Los resultados de variación de pH se analizaron con un modelo de medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED, SAS, 9.1) que incluyó el efecto animal, período, tratamiento, hora de muestreo y la interacción tratamiento por hora de muestreo. La variable repetida fue día de muestreo dentro de cada combinación vaca*período. Se consideró como diferencias significativas una probabilidad menor a 0,05.

RESULTADOS

Consumo

No hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el consumo de MS de la dieta base, pero si ocurrió un mayor consumo de MS total para el tratamiento C+A con respecto a los tratamientos C y C+M (3,7% del PV para C+A vs 3,1% del PV para C y C+M) (Cuadro 5).

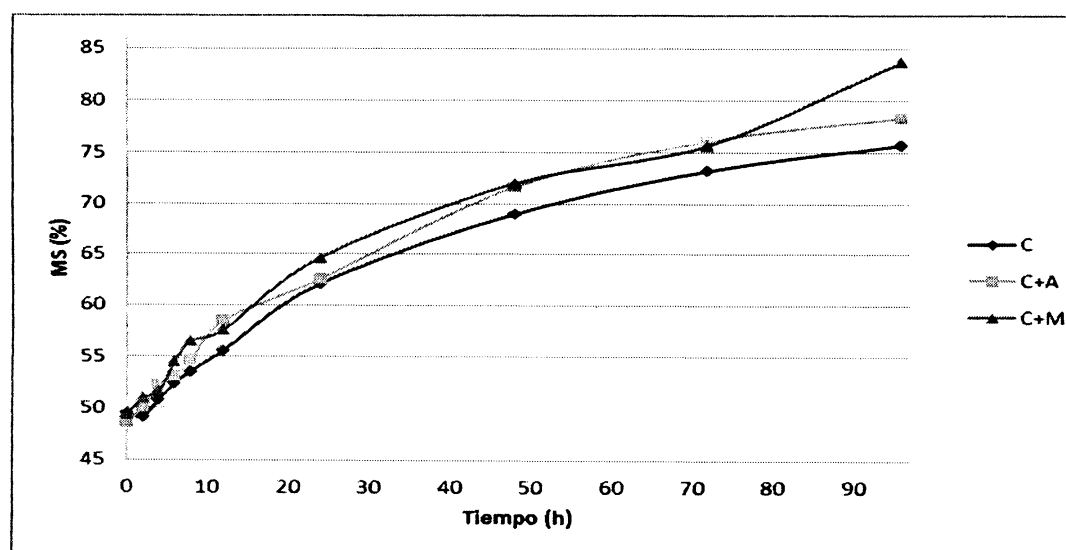
Cuadro 5: Consumo de MS de ensilaje de sorgo (ES), Actibiol[®] y MEBA; y consumo de MS total (CMS total) para los diferentes tratamientos ($p < 0,05$; diferencias significativas se expresan con letras diferentes).

| Consumo | C | C+A | C+M | EEM |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| ES Kg MS/día ⁻¹ | 15,3 | 14,8 | 14,7 | 0,63 |
| ACTIBIOL [®] Kg MS/día ⁻¹ | ---- | 3,2 | ---- | ---- |
| MEBA Kg MS/día ⁻¹ | ---- | ---- | 0,4 | ---- |
| CMS total Kg MS/día ⁻¹ | 15,3 ^b | 18,0 ^a | 15,1 ^b | 0,61 |

C: Control; C+A: Control + Actibiol[®]; C+M: Control + MEBA; EEM: error estándar de la media.

Degradabilidad de la MS de ensilaje de sorgo

En la figura 5 se muestra la evolución en la pérdida de MS ocurriendo un aumento más marcado después de las 12 h de incubación. La evolución diaria fue similar para todos los tratamientos.



C: Control; C+A: Control + Actibiol[®]; C+M: Control + MEBA.

Figura 4: Desaparición de MS según el tiempo de incubación.

No hubieron diferencias significativas ($p < 0,05$) para ninguna de las fracciones estimadas (fracción soluble a; fracción potencialmente degradable b; y tasa de degradación de la fracción potencialmente degradable c) del ensilaje de sorgo incubado en cada ambiente ruminal en los distintos tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6: Parámetros de degradabilidad ruminal de la MS de ensilaje de sorgo para los tratamientos C; C+A; C+M ($p < 0,05$; letras diferentes expresan diferencias significativas)

| Parámetros | C | C+A | C+M | EEM |
|-----------------------|-------|-------|-------|------|
| a (%) | 46,98 | 47,50 | 49,64 | 0,88 |
| b (%) | 34,50 | 33,95 | 33,06 | 2,4 |
| c (%h ⁻¹) | 2,191 | 2,422 | 2,663 | 0,43 |

a(%): fracción soluble; b(%) fracción insoluble potencialmente degradable; c(%h⁻¹) tasa de degradación de la porción potencialmente degradable; C:Control; C+A: Control + Actibiol®; C+M: Control + MEBA; EEM: error estándar de la media.

pH ruminal

No se detectó diferencias significativas ($p > 0,1$) para los valores medios de pH entre tratamientos (C=6,48; C+A=6,36; C+M=6,48 con un EEM (error estándar de las medias) de 0,072). La variación de pH a lo largo del día fue significativa ($p < 0,01$) aunque no difirió significativamente entre tratamientos en cada hora (interacción tratamiento por horario de muestreo, $p > 0,1$) (Figura 5).

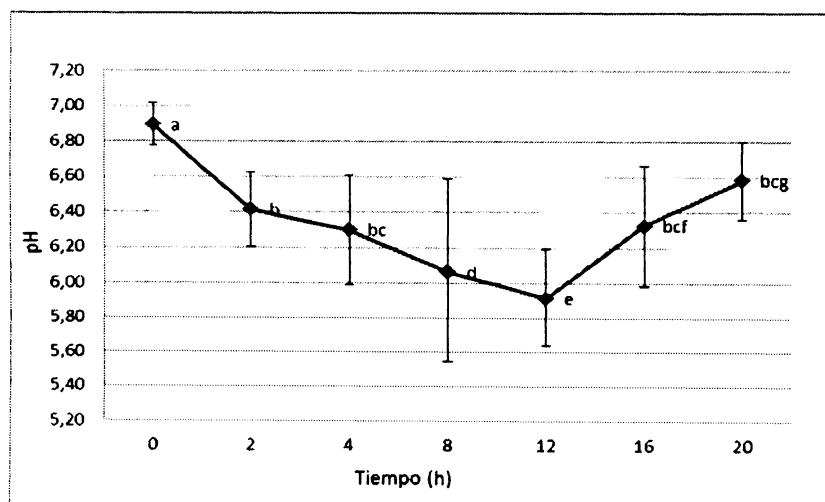
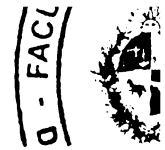


Figura 5: Variación de pH en función del tiempo.

DISCUSIÓN



Consumo

Los resultados obtenidos fueron los esperados, la aplicación de los tratamientos C+A y C+M no produjeron cambios significativos en el consumo en MS de ensilaje de sorgo.

Para el tratamiento C+A indica que no hubo sustitución, siendo además el consumo total de MS superior que el tratamiento C, lo cual revela un efecto de adición. El beneficio obtenido de dicho efecto aditivo podría verse reflejado en un aumento del peso corporal, como ocurrió en evaluaciones realizadas por ALUR SA (2010) en predios comerciales, donde se observó un aumento de 0,56 a 0,72 kg/animal/día en terneros suplementados con sorgo vs los alimentados con Actibiol®.

El hecho de que el tratamiento C+A no haya causado una sustitución de la dieta base, sugiere que el mismo no alteró el patrón de fermentación ruminal en forma significativa. Debemos tener en cuenta que las cantidades suministradas de concentrado (C+A), fueron bajas al comparar con otros experimentos, donde la relación concentrado forraje fueron mayores. Esto podría estar explicando el hecho de que a pesar de estar trabajando con animales con bajos requerimientos (no lactando, no gestando o con pequeña gestación), éstos adicionaron el Actibiol®, pese a tener sus requerimientos satisfechos y la capacidad del rumen llena al consumir la dieta de ensilaje de sorgo *ad libitum*.

Como en el presente trabajo, algunos autores obtuvieron resultados positivos debido a la suplementación con distintos tipos de concentrados sobre el consumo de MS total. Así, Koza *et al.* (2004) administrando semilla de algodón hasta 1,8 kg MS/día a novillos con una dieta base de "pasto estrella", observaron el aumento del consumo total de MS. Bargo *et al.* (2003), notificaron un aumento del 24% en la ingestión de MS total cuando se suministro 10 kg de MS/día de concentrados energético y proteico. Ambos notifican aumento en el consumo total de MS, que puede enmascarar cierta tasa de sustitución de forraje por concentrado, lo que no ocurrió en nuestro estudio.

El tratamiento C+M no produjo cambio en el consumo total de MS con respecto al tratamiento C, ya que se trata de un suplemento líquido aporta poca cantidad de Kg de MS por día al total de consumo de MS. Por otra parte creemos que el mismo no alteró en forma negativa ni positiva el ambiente de la fermentación ruminal en forma significativa, generando que no ocurriese ni disminución ni aumento del consumo de ensilaje de sorgo. No esperábamos que el consumo de ensilaje aumentase con la adición de MEBA, por la misma razón que ya se mencionó de que se trata de animales cuyos requerimientos están cubiertos con la dieta base.

Al comparar con otros trabajos en los que se suplementó con microorganismos, vimos que éstos reportaban un aumento de la ingesta de MS así Desnoyers *et al.* (2009) (utilizando levaduras vivas), también Williams *et al.*, (1991), Yoon y Stern (1995) y Beharka *et al.* (1991) que se proporcionaron cultivo de levaduras u hongos.

Degradabilidad ruminal

Evaluando los resultados obtenidos se puede decir que los tratamientos no alteraron la cinética de la degradación ruminal de la MS, dándose el mismo patrón para todos los tratamientos.

El ensilaje de sorgo utilizado tuvo un promedio de 43,85% de FND, valor que al compararlo con las tablas del NRC (2000) y del INTA (2002) está por debajo de los promedios de FND presentados por éstas, para el mismo alimento (60,8 y 53,5% respectivamente). En cuanto a MS, el alimento utilizado tuvo un promedio de 32,86%, valor similar a los registrados por NRC (2000) e INTA (2002) (30,0 y 34,1%, respectivamente). Los valores comparados implican que el ensilaje de sorgo empleado en nuestro trabajo, poseía menos pared celular que el promedio de los ensilajes utilizados, y es probable que tuviese un alto contenido de almidón por lo que presentaría una mejor calidad que éstos, pese a presentar un valor de fracción c (tasa de degradación de la fracción potencialmente degradable) bajo ($2,2 \text{ \%h}^{-1}$), propio de forrajes de baja calidad.

En este trabajo no se encontraron diferencias en la degradabilidad ruminal para el tratamiento C+A y C+M, esto en parte se podría explicar porque el ensilaje de sorgo utilizado como se vio no fue de mala calidad, por lo que el desbalance en el tiempo de llegada de la energía y proteína al rumen se presume no fue tan acentuado. Los animales del experimento no tenían altos requerimiento por lo que el ensilaje usado cubría los mismos. También puede haber ocurrido que el diseño utilizado fue poco potente para detectar diferencias significativas entre parámetros, o ambas teorías pueden estar operando en forma conjunta.

Las fracciones de degradación rápidas (fracción soluble a) no se alteraron puesto que el sustrato incubado fue el mismo, y no tuvieron contacto con los tres diferentes ambientes ruminales, por lo que era esperable.

López (2009) utilizó en una dieta base de pasto estrella, suplementación proteico-energética en proporciones y características similares a las nuestras, reportando un aumento en la degradabilidad de la MS y la FND. Encontró un aumento en la tasa de degradación si bien la fracción b no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Dicho autor señala que el concentrado otorga condiciones favorables al ambiente ruminal, ya que proporciona PC y EM, lo que aumentaría la actividad celulolítica y la biomasa bacteriana. Bargo *et al.* (2003), observaron que la suplementación 10 kg MS/día con concentrados energéticos no afectó la digestión *in situ* de los forrajes, a excepción de una reducción en la tasa de degradación, mientras que al suplementar con proteína aumentó la degradabilidad de la FND.

En el uso de aditivos microbianos a diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, Doreau *et al.* (1998), reportaron un incremento en la digestibilidad de la MS y la FND al suplementar con *S. cerevisiae*. Denev *et al.* (2007) afirma que las levaduras estimulan la digestión de la FND en animales consumiendo alimentos de baja digestibilidad, lo cual lo atribuye a una estimulación secundaria sobre los hongos ruminales. Por otra parte Dawson *et al.* (1990) afirman que aunque la suplementación con levadura no siempre mejora la digestibilidad de sustrato fibroso en el rumen, los suplementos de cultivos de levadura pueden estimular el

crecimiento de microorganismos celulolíticos en el rumen lo cual podría haber ocurrido en presente. Para el caso de Yoon y Stern (1996) encontraron que la digestión de la fibra en el rumen fue similar para los tratamientos con levaduras y cultivos de hogos que para los controles y Oellermann *et al.* (1990) suplementando con *Aspergillus oryzae*, no encontraron diferencias en la digestibilidad de la PC, la FAD y la FND para los diferentes tratamientos lo cual concuerda con éste trabajo.

Un aspecto a destacar es que los estudios reportados son muy variables en cuanto a microorganismos y dosis utilizados, como así también dietas administradas y calidad de las mismas, y este hecho hace que los resultados no siempre sean comparables. Otra salvedad es, que como ya se explicó antes, MEBA es un pool de mo y la mayor parte de la bibliografía reporta estudios sobre mo aislados lo que también hace que muchas veces no sean comparables pero se torna interesante a la investigación.

pH ruminal

Los valores de pH descendieron hasta 5,9 a las 12 horas de proporcionada la dieta base, lo que según Abdelhadi *et al.* (2000) y Calsamiglia (1997) están por debajo de los niveles considerados óptimos para la actividad celulolítica. Kamra (2005) también reporta como óptimo para el crecimiento de la misma rango de 6,0 a 6,9.

Con respecto al patrón de variación diurna del pH ruminal, se observó que el mismo disminuyó poco después de comer alcanzando valores mínimos a las 12 h, después de lo cual aumenta gradualmente y regresa a un pH normal (> 6,0) durante la noche, coincidiendo con lo descrito por Rustomo *et al.*, (2006).

No se encontraron diferencias significativas en la variación de pH para los diferentes tratamientos, esto fue debido a que el consumo de ensilaje de sorgo definió la variación de pH de todos los tratamientos. Para el caso del tratamiento C+A sugiere por una parte que se consume lentamente y que es bien utilizado por los microorganismos del rumen, o que la cantidad suministrada no generó disturbios como podría ser acidosis.

López (2009) utilizó suplementación estratégica con concentrado proteico-energético en proporciones similares a éste trabajo, y ésta influyó en los valores de pH ruminal presentando valores inferiores al tratamiento control. Se encontró un descenso de los valores de pH ruminal a partir de la hora cero, y se constataron los valores más bajos entre las 4 y 16 hs de muestreo. Bargo *et al.* (2003) encontraron que el aumento de concentrado hasta 10 kg MS/día redujo el pH ruminal en 0,08 unidades, respecto a los controles sin suplementar.

Cuando se suministran mo los estudios tienden a dar como resultado un leve aumento en el pH ruminal. Dawson *et al.* (1990) suplementaron novillos con *S. cerevisiae* y lactobacilos reportando un incremento en el pH ruminal. En la revisión de trabajos realizada por Desnoyers *et al.* (2009), los suplementos con levadura dieron como resultado un aumento de + 0,03 unidades de promedio. El efecto positivo de los suplementos de levadura en el pH ruminal, aumentó con el porcentaje de concentrado en la dieta y con el aumento en el consumo de MS y se correlacionó negativamente, con el nivel de fibra detergente neutra (FDN). Nocek *et al.* (2002) encontraron que el pH ruminal disminuía al aumentar la dosis de DFM en dieta,

aunque utilizando específicamente una dosis de 1×10^5 ufc/ml ayudaría a reducir la acidez ruminal diurna.

Beharka *et al.* (1991) observaron que al suplementar con *Aspergillus oryzae* el pH ruminal se mantenía estable a pesar de ocurrir un aumento en la concentración de los ácidos grasos volátiles, lo que fue atribuido a un aumento en la producción de saliva por el aumento en el consumo de MS. Lo mismo ocurrió para el trabajo de Yoon y Stern (1996), en el que al suplementar con levaduras y un cultivo de hongo no se encontraron diferencias en el pH. Estos trabajos obtuvieron resultados más similares a los obtenidos en el presente estudio.

Cualquier esperanza de éxito en la manipulación de la dieta debe tener en cuenta la complejidad de la interacción de los animales, el medio ambiente, los microbios del rumen, y la dieta, y tal vez hacer las designaciones más específicas de nutrientes para la sincronización más allá de proteínas y energía (Hall *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

El consumo de MS de la dieta base, no fue afectado con el agregado de Actibiol[®], el concentrado fue adicionado provocando un aumento en el consumo total de MS. El agregado de MEBA no afectó el consumo de MS de ensilaje de sorgo.

La degradabilidad "*in situ*" de la MS del sorgo no varió significativamente con la adición de Actibiol[®], o MEBA.

Se registró una variación de pH ruminal a lo largo del día determinada por la ingestión de ensilaje de sorgo, alcanzando valores mínimos a las 12 horas de su suministro. La suplementación con los productos antes mencionados no modificó significativamente ni los valores medios de pH ruminal, ni su variación a lo largo del día.

1. Abdelhadi, L. (2005). Los silajes en la producción animal: importancia de la calidad. Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. XI, Buenos Aires, Argentina, 114-131p. Disponible en: www.avpa.ula.ve/eventos/xi_seminario/Conferencias/Articulo-12.pdf. Fecha de consulta: 10/6/2011.
2. Abdelhadi L., Santini F.J., Gagliostro, G.A. (2000). Suplementación con silajes de planta entera a bovinos en pastoreo: efecto sobre la producción y el ambiente ruminal. Revisión realizada en el Curso de Posgrado en Producción Animal 1998-2000 de la Facultad de Ciencias Agrarias UNMdP- INTA EEA Balcarce. 12 p.
3. Acedo J., González, R. (1998). Utilización de aditivos en piensos para rumiantes: Minerales forma orgánica, levaduras, enzimas, ionóforos y otros. Curso De Especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal: Avances en nutrición y alimentación animal. XIV, Barcelona, España, p 47-66.
4. Aguerre M. (2010). Suplementación con grano 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. Programa de Posgrado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. p 3-16.
5. Allen M. (1997). Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* 80 (7): 1447–1462.
6. ALUR S.A (2010). Valoración de subproductos agrícolas y agroindustriales en la alimentación de bovinos, a través de activadores de la fermentación ruminal. Jornada de divulgación, 4 de diciembre, Tomás Gomensoro, Uruguay.
7. Ando S., Khan R. I., Takahasi J., Gamo Y., Morikawa R., Nishiguchi Y., Hayasaka K. (2004). Manipulation of rumen fermentation by yeast: the effects of dried beer yeast on the in vitro degradability of forages and methane production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 17: 68-72.
8. Arreaza, L., Sánchez, D., Abadía, B. (2005). Degradabilidad ruminal de fracciones de carbohidratos en forrajes tropicales determinada por métodos in vitro e in situ. *Revista Corpoica*.6(1). Disponible en: http://www.corpoica.org.co/sitioweb/libreria/verarticulo.asp?id_contenido=146. Fecha de Consulta: 13/5/2011
9. Association of Official Agricultural Chemists (1990). Official methods of analysis. 15^a ed. AOAC. Arlington, VA, USA.

10. Bach A., Calsamiglia S. (2006). La Fibra En Los Rumiantes ¿Química o Física? Curso De Especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. XXII Barcelona, España, p 99-113.
11. Bargo F., Muller L.D., Kolver E.S., Delahoy J. E. (2003). Invited review: production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science* 86 (1):1-42.
12. Beharka A., Nagaraja T.G., Morrill J.L. (1991). Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Journal of Dairy Science* 74: 4326-4336.
13. Blanco, M. (1999). Bacterias Ruminales. Disponible en: <http://www.agrarias.unlz.edu.ar/files/anatomia/bacterias%20ruminales.htm>. Fecha de Consulta: 15/ 5/ 2011.
14. Bohnert D., Schauer C.S., Del Curto T. (2002). Influence of rumen protein degradability and supplementation frequency on performance and nitrogen use in ruminants consuming low-quality forage: cow performance and efficiency of nitrogen use in wethers. *Journal of Animal Science* 80: 1629-1637.
15. Boschini C., Amador A. (2001). Degradabilidad de la planta de sorgo negro forrajero (*Sorghum Almum*) en diferentes etapas de crecimiento. Universidad de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 12(002): 169-174.
16. Brydl E., Jurkovich V., Könyves L., Kutasi J. (2005). Characterisation of the biological activity of viable yeast on the basis of oxygen consumption in the ruminal fluid. *International Society for Animal Hygiene. XII Congreso ISAH. Warsaw, Poland* 1: 151-154.
17. Caja G., González E., Flores C., Carro M.D., Albanell E. (2003). Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. Curso de Especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. XIX, Madrid, España, p 183-212.
18. Callaway E., Martin S. (1997). Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science* 80: 2035-2043.
19. Calsamiglia S. (1997). Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. Curso De Especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. XIII, Madrid, España, p 3-19.
20. Calsamiglia S., Castillejos L., Busquet M. (2005). Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacunos lecheros. Curso de especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. XXI, Madrid, España, p 161-185.

21. Calsamiglia S., Ferret A., Bach A. (2004). Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de forrajes y subproductos fibrosos húmedos. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, Madrid, España, 42 p. Disponible en: <http://fundacionfedna.org/forrajes/ensilado-de-sorgo>. Fecha de consulta: 28/4/2011.
22. Cañas, R., Aguilar, C. (1992). Uso de la bioenergética en producción de bovinos. Simulación de sistemas pecuarios, San José, IICA, 55 p.
23. Carro M., Ranilla M. (2002). Los aditivos antibióticos promotores de crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. Producción bovina de carne. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/01-aditivos_antibioticos_promotores.htm. Fecha de consulta: 23/ 6/ 2011.
24. Chaucheyras F., Durand, Walker N.D., Bach A. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Animal Feed Science and Technology* 145: 5-26.
25. Chilbroste P., Ibarra D., Zibil S., Laborde D. (2003). Proyecto alimentación reproducción, CONAPROLE 2002. Montevideo, CONAPLROLE, Informe final. 28p.
26. Chilbroste P. (1998). Fuentes comunes de error en la alimentación del ganado lechero en pastoreo: II. Balance de nutrientes. Jornadas Uruguayas de Buiatría. XXVI, Paysandú, Uruguay. p 8-12.
27. Church D. (1993). Función y producción de saliva. En: *El rumiante Fisiología digestiva y nutrición*. Editor: Church C.D., Zaragoza, Acribia, p 127-135.
28. Coria M. (2010). Efecto del aporte de ensilaje de sorgo a la dieta de vaquillonas que pastorean verdeo de trigo. Tesis presentada para optar al grado de magister en ciencias agrarias. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Disponible en: www.inta.gov.ar/bordenave/contactos/autores/maria/vaquillonas_que_pastorean_verdeo_de_trigo.pdf. Fecha de consulta: 13/6/2011.
29. Cozzolino D. (1994). Valor nutritivo de alimentos utilizados en la suplementación. Bovinos para carne. Avances en suplementación de la recría e invernada intensiva. INIA. Serie Actividades de Difusión N° 34. p 5.
30. Dawson K., Newman K. E., Boling J. A. (1990). Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *Journal of Animal Science* 68: 3392-3398.
31. De Blas C., García P. (1993). Tamaño de partícula de los forrajes en la alimentación de vacas lecheras y conejos. Bases fisiológicas y recomendaciones. Curso De Especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. IX, Barcelona, España, p 11-30.

32. De Blas C., Rebollar P., Méndez J. (1995). Utilización de cereales en dietas de vacuno lechero. Curso De Especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. XI, Barcelona, España, p 48-67.
33. De Leon M., (2004). Utilización de silajes en producción de carne bovina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Centro Regional Cordoba, Argentina. Informe técnico N°5. Disponible en: www.inta.gov.ar/manfredi/info/documentos/docprodani/deleon/inf.%20Tec.%2005%20Compl..pdf. Fecha de consulta: 15/7/2011.
34. Denev S., Peeva Tz., Radulova P., Stancheva N., Staykova G., Beev G., Todorova P., Tchobanova S. (2007) Yeast Culture in Ruminant Nutrition. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 13: 357-374.
35. Desnoyers M., Giger-Reverdin S., Bertin G., Duvaux-Ponter C., Sauvant D. (2009). Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. Journal of Dairy Science 92: 1620–1632.
36. Di Marco O., (2007). Calidad nutritiva de ensilajes de maíz o sorgo: ¿Híbridos sileros o graníferos? Jornada sobre Producción y Utilización de Ensilajes- Octubre de 2007. 69-82p. Disponible en: [www.agriseedsa.com.ar/pdf_folder/informacion/Jornada%20sobre%20producci%C3%B3n%20y%20utilizaci%C3%B3n%20de%20ensilajes%20\(Bah%C3%ADa%20Blanca,%20Octubre%202007\).pdf](http://www.agriseedsa.com.ar/pdf_folder/informacion/Jornada%20sobre%20producci%C3%B3n%20y%20utilizaci%C3%B3n%20de%20ensilajes%20(Bah%C3%ADa%20Blanca,%20Octubre%202007).pdf). Fecha de consulta: 14/4/2011.
37. Doreau M., Jouany J.P. (1998). Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 81: 3214–3221.
38. Elias A., Herrera F. (2008). Producción de alimentos para animales a través de procesos biotecnológicos sencillos con el empleo de Microorganismos Benéficos Activados (MEBA). Vitafert. Instituto de Producción Animal. Centro Universitario de Guantanamo. La Habana. 82 p.
39. Ferret A., (2003). Control de calidad de Forraje. Curso De Especialización Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. XIX, Madrid, España, p 137-150.
40. Galina M., Ortiz-Rubio M.A., Guerrero M. (2007). Desarrollo de cabras con o sin suplementación, con un probiótico de bacterias lácticas. Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. V, Mendoza, Argentina. 1-4 p. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 23/6/2011.
41. García Y., López A., Boucourt R. (2005). Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 39: 129-140.

42. Grovum W. (1993). *Apetito, sapidez y control del consumo de alimentos*. En: *El rumiante Fisiología digestiva y nutrición*. Editor: Church, D. C., Zaragoza, Acribia, p 225-241.
43. Hall M., Huntington G. B. (2008). *Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice*. *Journal of Animal Science* 86: 287-292.
44. Herrera P., Birbe B., Colmenares O. (2006). *La suplementación estratégica de rumiantes en condiciones de sabanas*. p 190-204. Disponible en: www.avpa.ula.ve/eventos/ii_simposio_pastca2006/10.pdf. Fecha de consulta: 13/5/2011.
45. Kamra D. (2005). *Rumen microbial ecosystem*. *Current Science*, 89: 124:135.
46. Koza G., Balbuena O., Kucseva C. D., Mussart N. B., Coppo, J. A. (2004). *Modificaciones del consumo voluntario de heno y del pH ruminal producidas por diferentes niveles de semilla de algodón en novillos*. *Comunicaciones científicas y tecnológicas 2004*. Universidad del Nordeste, Corrientes, Argentina. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/4-Veterinaria/V-015.pdf>. Fecha de consulta: 15/7/2011.
47. Lauric A., Marinissen A., Carbonell C., Balbarrey G., Cori M. (2009). *Suplementación estratégica*. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/bordenave/contactos/autores/lauric/suplementacion_est_rategica.pdf. Fecha de consulta: 6/ 8/ 2011.
48. Lila Z.A., Mohammed N., Yasui T., Kurokawa Y., Kanda S., Itabashi H. (2004). *Effects of a twin strain of Saccharomyces cerevisiae live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro*. *Journal of Animal Science* 82: 1847-1854.
49. López R. (2009). *Efecto de la suplementación con concentrado en indicadores de la fisiología digestiva y consumo de nutrientes en bucerros (Bubalus bubalis) alimentados con pasto estrella (Cynodon nlemfuensis)*. Tesis de grado. Instituto de producción animal, Centro Universitario de Guantánamo, La Habana, Cuba. 125 p.
50. Mancuso W., Santini F., Gagliostro G., Rearte D. (2002). *Suplementación con harina de girasol o de colza "00" a vacas lecheras alimentadas con dietas en base silaje de maíz*. *Revista Argentina de Producción Animal* 22(3-4): 169-184.
51. Maynard L., Loosli J.K., Hintz H.F., Warner R.G. (1988). *Procesos digestivos en diferentes especies animales*. En: Maynard L., Loosli J.K., Hintz H.F., Warner R.G. *Nutrición Animal* 4a. ed., México, McWraw-Hill, p 22-48.
52. McDonald P., Edwards, R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. (2006) *Nutrición Animal* 6a. ed. Zaragoza, Acribia, 587 p.

53. Methol M. (2006). Maíz y sorgo: situación y perspectivas. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario06/docs/12%20%20MAIZ%20Y%20SORGO%20METHOL.pdf>. Fecha de consulta: 28/3/2011.
54. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-DIEA (2007). La Producción Lechera En El Uruguay. Serie Encuestas Agosto N° 278, Agosto 2009. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,27,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU>. Fecha de consulta: 29/7/2011.
55. Montalbetti A. (2004). Microbiología del Rumen. Disponible en: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EpZyuyAlApvcKnivWu.php>. Fecha de consulta: 19/ 8/ 2011.
56. Nocek J., Kautz W.P., Leedle J.A.Z., Allman J.G. (2002). Ruminant supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85:429–433.
57. Nutrient Requirements of Beef Cattle: Seventh Revised Edition (2000). Disponible en: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9791&page=140. Fecha de consulta: 12/09/2011.
58. Oellermann S.O., Arambel M.J., Kent B.A., Walters J.L. (1990). Effect of Graded Amounts of Aspergillus oryzae Fermentation Extract on Ruminant Characteristics and Nutrient Digestibility in Cattle. *Journal of Dairy Science* 73: 2413-2416.
59. Orskov, E., I. McDonald. (1979). The estimate of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92: 499-503.
60. Owens F., Goetsch A.L. (1993). Fermentación Ruminal. En: Owens F., Goetsch A.L. El rumiante, fisiología digestiva y nutrición. Church, D. C., Zaragoza, Acribia, p 159- 189.
61. Pérez A., (2010). Tiempo y forma de acceso al forraje y uso de buffers o levaduras: efecto sobre el aprovechamiento digestivo de la dieta en ovinos. Tesis de maestría en nutrición de rumiantes. Programa de Posgrado. Facultad de veterinaria. Universidad de la Republica. p 4-13.
62. Pigurina G. (1993). Aspectos nutricionales de la suplementación de terneros en condiciones de pastoreo. INIA Treinta y Tres. Serie Actividades de Difusión N° 49. p 29-34.
63. Regueiro M., Van Lier E. (2008). Digestión En Reticulo-Rumen. Departamento De Producción Animal Y Pasturas Curso De Anatomía Y Fisiología Animal. Facultad de Agronomía, Universidad de la Republica. 31 p.

64. Repetto J., Cajarville C. (2009). ¿Es posible lograr la sincronización de nutrientes en sistemas pastoriles intensivos? Conferencia de Repetto. Jornadas Uruguayas de Buiatría. XXXVII, Paysandú, Uruguay. p 60-67.
65. Ribeiro L., Rodriguez N. M., Gonçalves L. C., de Assis D. A. (2007). Consideraciones Sobre Ensilajes De Sorgo. Jornada sobre Producción y Utilización de Ensilajes- Octubre de 2007. p 51-68. Disponible en: www.cpatas.embrapa.br/public_electronica/downloads/OPB1703.pdf. Fecha de consulta: 14/4/2011.
66. Rustomo B., AlZahal O., Odongo N. E., Duffield T. F., McBride B. W. (2006). Effects of rumen acid load from feed and forage particle size on ruminal pH and dry matter intake in the lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science* 89:4758–4768.
67. Sanchez M., Calsamiglia S., Ferret A. (2007). Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science*. 90: 1486–1492.
68. Scandolo D., Noro M., Böhmwald C., Wittwer F. (2007). Variación diurna del pH y de las concentraciones de magnesio y potasio del fluido ruminal en vacas lecheras a pastoreo. *Revista Archivos de Medicina Veterinaria* 39 (2). Disponible en: www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2007000200007&script=sci_arttext. Fecha de consulta: 28/5/2011.
69. Silva de Oliveira J., De Moura A., Santos E. (2007). Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. *Revista electrónica de Veterinaria*, VIII (6). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607.html>. Fecha de consulta: 25/4/2011.
70. Tabla de composición de alimentos para rumiantes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (2002) Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/nutricion/calimentos.htm>. Fecha de consulta: 12/09/2011.
71. Van Soest P.J., Roberston J.B., Lewis B.A. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583–3597.
72. Vinhas L., De Campos S., Ferreira da Silva F., Ferreira R., Leão M., Cecon P., Brandão C., Bevitori E., Navajas L., Rodrigues P. (2002) Produção microbiana e parâmetros ruminiais de novilhos alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31:1553-1561.
73. White H., Wolf D. (2009). Controlled grazing of virginia's pastures. extension agronomists, forages, crop and soil environmental sciences department, virginia tech. Disponible en: www.pubs.ext.vt.edu/418/418-012/418-012.html. Fecha de consulta: 19/ 8/ 2011.

74. Williams P., Tait C. A., Innes G. M., Newbold C. J. (1991). Effects of the inclusion of yeast culture (*saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *Journal of Animal Science* 69: 3016-3026.
75. Yokoyama M., Johnson K.A. (1993). Microbiología del rumen e intestino. En: Yokoyama M., Johnson K.A. *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición.*, Zaragoza, Acribia, p 137-157.
76. Yoon I., Stern M.N. (1995). Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants: a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 8: 533-555.
77. Yoon I., Stern M.D. (1996). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 79: 411-417.
78. Young M., Dalke B., Sonon R., Holthaus D., Bolsen K. (1996). Effect of grain content on the nutritive value of whole-plant grain sorghum silage. *Cattlemen's day*. Disponible en: www.krex.k-state.edu/dspace/bitstream/2097/4860/1/cattle96pg65-67.pdf. Fecha de consulta: 20/5/2011.
79. Zanoniani R., Ducamp F., Bruni M. (2003). Utilización de verdes de invierno en sistemas de producción animal. *Producción bovina de carne*. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_verdeos_invierno/66-verdeos.htm. Fecha de consulta: 18/ 8/ 2011.