

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**TIEMPO DE ACCESO A UN FORRAJE FRESCO DE ALTA CALIDAD: EFECTO
SOBRE LA ACTIVIDAD FERMENTATIVA RUMINAL EN TERNERAS**

Por

**ROSANO, Keña
SAAVEDRA, Karla**

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

Orientación: Higiene, Inspección, Control y
Tecnología de los Alimentos de origen animal

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Segundo miembro (Tutor):

DCV. MSc. Natalia Hernández

Tercer miembro:

Cuarto miembro (Co-tutor):

DMTV PhD. Cecilia Cajaville

Fecha:

Autores:

Br. Keña Rosano

Autores:

Br. Karla Saavedra

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las Dres. Natalia Hernández y Cecilia Cajarville por su tutoría, co-tutoría y por el apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

A los integrantes del Departamento de Bovinos y Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria, especialmente a Alicia Félix, Analía Pérez, Martín Aguerre, Álvaro Santana, Sebastián Brambillasca y Alejandro Mendoza por su trabajo junto a nosotros tanto en el campo como en laboratorio en el desarrollo de este ensayo.

A todos nuestros compañeros con los que compartimos el trabajo experimental.

A todo el personal del Campo Experimental N° 2 (Libertad) de la Facultad de Veterinaria quienes nos brindaron apoyo durante este proceso.

A todas aquellas personas que de una forma u otra nos apoyaron en el recorrido de nuestra carrera.

Agradezco en primer lugar a mi padre Eduardo, mi madre Narriman, mi hermana Anabela, a Gonzalo mi gran compañero, a mis amigos por todo el apoyo que me han brindado y a mi amiga Karla Saavedra por haber compartido su carrera y éste trabajo conmigo.

Keña Rosano

Quiero agradecer especialmente a mis padres y hermana por estar siempre presentes, por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida.

A mi compañera de Facultad, tesis y de vida, Keña Rosano.

A mi abuela quien no está más pero a cada exámen aprobado festejaba con mis logros.

A mi marido por siempre creer en mi inclusive más que yo misma.

A los hermanos de la vida que hice en Facultad que si no fuera por ellos todo sería más difícil.

Karla Saavedra

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
LAS PASTURAS TEMPLADAS COMO BASE DE LA ALIMENTACIÓN EN RUMIANTES	12
ECOSISTEMA RUMINAL	12
RESTRICCIÓN DEL TIEMPO DE ACCESO A LA PASTURA	14
FERMENTACIÓN <i>IN VITRO</i>	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL	20
TRATAMIENTOS	20
ALIMENTOS Y MANEJO	20
MEDICIONES Y CÁLCULOS	21
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL INÓCULO	21
PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i>	21
DIGESTIBILIDAD VERDADERA <i>IN VITRO</i>	22

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
RESULTADOS	25
PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i>	25
DIGESTIBILIDAD VERDADERA <i>IN VITRO</i>	25
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
Cuadro I. Composición química promedio de la pastura (% en base seca) utilizada durante el período experimental.	21
Cuadro II. Composición química (% en base seca) de los alimentos de la colección utilizados para las pruebas <i>in vitro</i>	23
Cuadro III. Volumen de gas acumulado hasta la hora 96 de incubación <i>in vitro</i> para los diferentes sustratos, utilizando como inóculo el líquido ruminal de terneras alimentadas durante diferente tiempo de acceso al forraje fresco	25
Cuadro IV. Digestibilidad verdadera <i>in vitro</i> de diferentes alimentos utilizando como inóculo el líquido ruminal de terneras alimentadas durante diferente tiempo de acceso al forraje fresco.	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV	ácidos grasos volátiles
CH	carbohidratos
EEM	error estándar de la media
FAD	fibra ácido detergente
FND	fibra neutro detergente
DVIV	digestibilidad verdadera <i>in vitro</i>
Mo	microorganismos
MO	materia orgánica
MS	materia seca
NH₃	amoníaco
N-NH₃	nitrógeno amoniacal
P	probabilidad del efecto del tratamiento
PB	proteína bruta
PV	peso vivo
PM	proteína microbiana

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la restricción en el tiempo de acceso al alimento sobre las actividades de fermentación a nivel ruminal en terneras alimentadas con un forraje fresco de alta calidad. Se utilizaron 24 terneras cruza Hereford x Angus de $10,1 \pm 0,3$ meses de edad y $153,0 \pm 18,1$ kg de peso, las cuales fueron alojadas en jaulas metabólicas durante el período experimental. Los animales fueron distribuidos según un diseño de bloques al azar entre los siguientes tratamientos: 4, 6, 8 o 24h diarias de acceso al forraje (T4, T6, T8 y T24, respectivamente). Se utilizó una pastura en estado vegetativo (*Lolium multiflorum* y *Trifolium repens*) que fue cortada diariamente y ofrecida a los animales (sin restricción de cantidad) como único alimento durante el tiempo establecido para cada tratamiento. Se estudió la actividad del inóculo de los animales mediante la producción de gas y la DVIV de diferentes sustratos. Los resultados fueron analizados como medidas repetidas en el tiempo con un modelo lineal mixto. La actividad fermentativa del inóculo ruminal fue mayor para T24 ($P=0,048$) que para T8, T6 y T4 frente al sustrato pradera del experimento, no observándose diferencias entre tratamientos para los sustratos alfalfa, heno y ensilaje. En cuanto a la digestibilidad *in vitro* de los animales sometidos a los diferentes tratamientos se observó una tendencia ($P= 0,083$) a una mayor digestión de los alimentos para las terneras con acceso al forraje sin restricción (T24). Se concluyó que restringir el tiempo de acceso al alimento en terneras afectó la actividad fermentativa ruminal.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of restricting the access time to feed on the ruminal fermentation in heifers fed with fresh high quality forage. Twenty four cross heifers Hereford x Angus of 10.1 ± 0.3 months of age and 153.0 ± 18.1 kg were used, which were housed in metabolic cages during the experimental period. The animals were distributed according to a design of complete blocks at random in the following four treatments: 4, 6, 8 or 24 hours of daily access to forage (T4, T6, T8, T24, respectively). A pasture in the vegetative state (*Lolium multiflorum* y *Trifolium repens*) was used, which was cut every day and offered to the animals (without quantity restriction) as the only food during the time established for every treatment. The activity of the ruminal inoculum of the animals was studied through the production of gas and the true digestibility in vitro of different substrates. The results were analyzed as repeated measures using the mixed model. The fermentative activity of the ruminal inoculum was higher for T24 ($P=0.048$) than for T8, T6 and T4 in compared to the experimental pasture. No differences between treatments for alfalfa, hay and silage substrate were observed. In regard to in vitro digestibility of animals submitted to different treatments, a trend to a higher digestibility for heifers with access to forage without restriction was observed ($P=0,083$). It was concluded that restricting the time of access to the forage in heifers affected the ruminal fermentative activity.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay, los sistemas de producción de leche y de carne intensivos y semi-intensivos se han basado tradicionalmente en la utilización de pasturas de alta calidad mediante el pastoreo directo de praderas y verdeos como fuente principal de alimentación de rumiantes (Repetto y Cajarville, 2009). Esto es posible gracias a las condiciones climáticas muy favorables para la producción de forrajes además de tener una excelente relación costo/beneficio, lo cual representa una reducción importante de los costos de producción. Sin embargo, aunque la calidad del forraje es muy elevada, la cantidad de que se dispone en ciertas épocas del año puede ser limitante (Pérez-Ruchel, 2010).

Según un relevamiento realizado en nuestro país que incluyó forrajes de especies de gramíneas, leguminosas y compuestas, provenientes de más de 40 parcelas de establecimientos productivos, se reportó que las pasturas presentaron una composición promedio de 18% de MS, 19% de PB, 40% de FND y entre un 6 y un 10% de azúcares (Antúnez y Caramelli, 2009). El consumo de estas pasturas, aporta materias nitrogenadas y componentes fibrosos muy degradables que generan elevadas concentraciones de N-NH₃, jugando un importante papel en la producción microbiana y por lo tanto en el aporte de proteína al rumiante (Cajarville y Repetto, 2005). Debido a la composición química de estas pasturas, la fermentabilidad a nivel ruminal medida a través de la producción de gas *in vitro* es elevada (Antúnez y Caramelli, 2009), con concentraciones máximas de AGV totales a la hora 4 en relación al inicio de la ingesta (Pérez-Ruchel, 2006).

Cada grupo de mo presente en el rumen posee un pH óptimo para poder desarrollarse. Valores de pH entre 5,6 y 6,9 favorecen el desarrollo de la microbiota normal del rumen (Relling y Mattioli, 2003). Según Van Soest (1994) las condiciones ruminales óptimas para la producción microbiana y que no afecten la degradación de los componentes fibrosos de los forrajes se caracterizan por un pH cercano a la neutralidad (6,7-6,8), una concentración de NH₃ de al menos 5-8 mg/dL y de AGV de 75-90 mmol/mL. Diversos trabajos realizados por el Departamento de Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria (Uruguay) con bovinos y ovinos consumiendo pasturas templadas, muestran que la concentración media de los AGV fue de 95 mmol/mL de líquido ruminal, con valores máximos de 130 mmol/mL. Por otro lado, se observaron valores mínimos de pH a la hora 3 y 4 del inicio de la ingesta, siendo estos inferiores a 6,2 durante hasta 9 h/día (Cajarville y col. 2006a).

Restringir el tiempo de acceso a la pastura resulta ser una medida de manejo favorable no solo para la producción de la pastura sino también para maximizar su utilización, ya que reduce los efectos negativos de los animales en la misma como el pisoteo (Chilibroste y col. 2007).

Los trabajos referentes al tiempo de acceso a la pastura son principalmente en ganado lechero con variados tiempos de acceso, 6,5 vs 4h (Kristensen y col. 2007), 22 vs 9 vs 5,5h (Pérez-Rámirez y col. 2009), otros autores realizaron restricciones de 22 vs 9 vs 6h (Kennedy y col 2011) y 16 vs 8h (Chilibroste y col 2007) los cuales

estudiaron cómo afectaba al consumo y producción de leche. Por otro lado, en bovinos de carne, existe escasa información del efecto de la restricción en el tiempo de acceso a las pasturas. Algunos autores trabajaron con diferentes tiempos de acceso al pasto y con diferentes categorías de animales; de 24 vs 12h (Gekara y col. 2005), 24 vs 5h (Ginane y Petit, 2005) y 11 vs 8 vs 4h (Gregorini y col. 2008). En ovinos, Zuccari y col. (2007) realizando restricciones de 24 vs 11h y (Pérez-Ruchel y col. 2012) 24 vs 6h, más un tratamiento de 6h con con agregado de levadura, estudiaron consumo, tasa de consumo y digestibilidad.

Es preciso entonces, generar información referida a los efectos del tiempo de acceso al forraje de pasturas templadas de buena calidad sobre el ambiente ruminal y su actividad de fermentación, para poder comprender las actividades ruminales que se presentan bajo condiciones de restricción de alimentos y complementar la información ya existente.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

LAS PASTURAS TEMPLADAS COMO BASE DE LA ALIMENTACIÓN EN RUMIANTES

Las producciones intensivas de rumiantes en nuestro país adoptan el uso de pasturas de alta calidad con su utilización directa, lo cual reduce los costos de producción. Estas pasturas están compuestas mayormente por gramíneas C3, leguminosas y sus mezclas (Cajarville y Repetto, 2005). Antúnez y Caramelli (2009) realizaron un relevamiento de diferentes pasturas de nuestro país, cortadas en el momento óptimo para su consumo, hallaron una composición química promedio de 18% de MS, 19% de PB, 40% de FDN y 6 a 10% de azúcares (dependiendo de la época del año y del momento del día) en base seca. El contenido de CH solubles pueden ser variables, se ha registrado un incremento hacia la tarde respecto a la mañana (Griggs y col. 2005), esto se explica porque la fotosíntesis causa un aumento en la concentración de CH solubles en las hojas, habiendo una disminución de esta concentración en la noche por la falta de éste proceso (Mayland y col. 2005). En cuanto a las paredes celulares de estas pasturas, se ha observado que son altamente digestibles (Cajarville y col. 2012), aunque esto puede variar debido a que existen diferencias en la calidad en las distintas etapas de su desarrollo y a medida que envejece su digestibilidad disminuye (Rovira, 1996). El consumo de estas pasturas aporta al rumiante material nitrogenado y componentes fibrosos muy degradables los cuales generan elevadas concentraciones de NH_3 jugando así un importante papel en la producción microbiana y por lo tanto en el aporte de PM al rumiante (Cajarville y Repetto, 2005).

A nivel nacional, Cajarville y col. (2006b) estudiando la frecuencia de alimentación en bovinos y ovinos consumiendo mezclas de gramíneas y leguminosas templadas, para un grupo alimentado solamente 2 veces al día, detectaron a la hora 4 post ingesta un valor de pH mínimo de 5,77 además de permanecer durante aproximadamente 11h por debajo de niveles considerados saludables para la adecuada degradación de la fibra. Por otro lado, Pérez-Ruchel (2006), trabajando con ovinos alimentados solamente con pasturas mezcla de gramíneas y leguminosas, cortadas en 2 horarios diferentes (7 am y 18 pm) e inmediatamente ofrecido y con tiempo de acceso de 4h a las mismas, reportó valores de pH de 5,6 para la mañana y 5,4 para la tarde a las 4 y 2h luego del comienzo de la comida, respectivamente. Por lo tanto, la restricción del tiempo de acceso a las pasturas puede hacer que varíen los valores de pH ruminal, no dependiendo solamente de la frecuencia de pastoreo, sino también de la intensidad y duración del mismo (Gregorini y col. 2008).

ECOSISTEMA RUMINAL

El sistema digestivo de los rumiantes es complejo y consta de 3 cámaras fermentativas pre-gástricas (retículo, rumen y omaso) a las que les sigue el estómago verdadero (abomaso). Éstas en conjunto con la población microbiana residente hacen posible la utilización de forraje a través de la degradación de los CH

estructurales del mismo, como la celulosa y hemicelulosa, que no son aprovechables por las especies monogástricas (Relling y Mattioli, 2003). El mayor aporte nutricional de los forrajes son polisacáridos unidos por enlaces de tipo β 1-4 los cuales solo pueden ser digeridos por enzimas producidas por los mo del rumen (Lovett y col. 2006).

El complejo retículo-rumen conforma la cámara de mayor tamaño, dónde ocurre gran parte de la digestión de los alimentos debido a la fermentación microbiana, con alta capacidad de almacenamiento y mezclado, haciendo que disminuya la velocidad de pasaje del alimento a través del tracto digestivo (Chilibroste, 2002). A su vez, constituye un ecosistema abierto y continuo proporcionando un ambiente ideal para el mantenimiento de una población microbiana muy diversa (Yokoyama y Johnson, 1993). Aproximadamente el 90 % de las paredes celulares digestibles de las pasturas son digeridas a nivel de rumen (Sauvant y col. 1995), dando como resultado la producción de AGV que le aportan al animal energía y proteína (Edwards y col. 2008).

Entre un 60 y 80% de los requerimientos energéticos del rumiante son cubiertos por los AGV absorbidos y en parte metabolizados en la mucosa ruminal (Relling y Mattioli, 2003). El acetato y butirato son usados principalmente como fuente de energía por los tejidos, o como sustrato para la lipogénesis, por otro lado el propionato es usado para la gluconeogénesis (Relling y Mattioli, 2003; France y Dijkstra, 2005). Los porcentajes de estos productos varían con la dieta y la frecuencia de alimentación, ya que debido a esto se generan cambios en las especies y el metabolismo bacteriano (Russell & Hespell, 1981). Por ésta razón, la cantidad y tipo de nutrientes absorbidos por los rumiantes, y la respuesta productiva del rumiante depende en gran medida de lo que ocurra a este nivel. En este sentido, el conocer los factores que pueden alterar las condiciones físicas o el equilibrio químico del rumen es muy importante, porque nos permite mejorar las condiciones de producción y el rendimiento de los animales (Araujo y Vergara, 2007).

La microbiota ruminal se compone principalmente por más de 200 especies de bacterias anaeróbicas, 25 géneros de protozoarios ciliados y alrededor de 5 géneros de hongos anaeróbicos. Se caracteriza además por ser una población muy densa, diversa y por presentar múltiples y complejas interacciones (Mc Sweeney y col. 2005). La microbiota que se desarrolla principalmente al ingerir forraje es la celulolítica y el pH óptimo para ésta es cercano a la neutralidad (Pereira y col. 2007), según Van Soest (1994), el pH ruminal de los animales a pastoreo se encuentra cercano a este óptimo ($6,7 \pm 0,5$); no obstante la mayoría de los mo están adaptados a un pH que varía de 5,5 a 7,0.

La velocidad con la que se desplazan los alimentos por el tracto digestivo es la que determina el tiempo que van a tener las enzimas microbianas y del animal en degradarlos, debido a esto, los factores que aumenten la velocidad de tránsito podrían disminuir la digestibilidad de los alimentos. Siendo así, aumentando el nivel de consumo aumenta la velocidad de pasaje de los alimentos por ende, la digestibilidad es menor (Colucci y col. 1982).

El pH representa uno de los principales parámetros que afectan directamente al crecimiento microbiano y en consecuencia a la fermentación ruminal. Al mismo tiempo, el pH ruminal se relaciona con el tipo de mo que predomina en el rumen (Pereira y col. 2007), siendo las bacterias celulolíticas sensibles a pH bajos haciendo que disminuya su actividad o número, bajando la tasa de digestión de la fibra de la pastura como en el caso del agregado de concentrados a la dieta de animales que consumen forrajes (Dixon y Stockdale, 1999).

El pH ruminal está influenciado por la ingestión de CH fermentescibles, la secreción de saliva que aporta sustancias tampón y la absorción y utilización de los ácidos producto de la fermentación ruminal (Zebeli y col. 2010). Los bovinos producen entre 100 y 180 lts de saliva por día, y el pH de esta oscila entre 8,1 y 8,3 por lo cual tiene la capacidad de elevar el pH ruminal. La velocidad de absorción de los AGV tiene una relación directa con su producción y una relación inversa con el pH (Relling y Mattioli, 2003). En situaciones donde los ácidos de la fermentación exceden los sistemas buffer produciendo gran descenso de pH ruminal puede llevar a la disminución de la función ruminal e incluso del desempeño del animal, según la gravedad del caso (Russell y Hespell, 1981).

Aparte del rol fundamental que poseen los mo ruminales en la digestión del alimento, su PM se considera la fuente principal de proteína para el rumiante, de alto valor biológico y elevada digestibilidad intestinal (Stern y col., 1994; Hoover y Miller, 1996; Dewhurst y col. 2000).

RESTRICCIÓN DEL TIEMPO DE ACCESO A LA PASTURA

En Uruguay, los sistemas de producción de carne y leche se basan en pastoreo directo de praderas y verdes como fuente principal de alimento de alta calidad (Cajarville y Repetto, 2005). El éxito de un sistema pastoril es el resultado de la producción de forraje, su utilización por parte de los animales y la eficiencia con que este forraje es transformado en producto por el animal (Hodgson, 1990). Sin embargo estos sistemas presentan ciertas limitantes como ser la “regulación física” que es uno de los principales mecanismos que limitan el consumo de MS (Félix y col. 2017). En éste sentido, cuando el tenor de humedad de las pasturas supera el 80% sobre todo en las gramíneas anuales (Cajarville y Repetto, 2005) lo que representa una limitante en el consumo (Demment y col. 1995).

Staddon (2003) afirma que el hambre motiva los animales a comer y esta motivación está dada por el tiempo disponible para comer y el tiempo transcurrido desde la última comida, o sea el ayuno (Jensen y Toates, 1993; Staddon, 2003). La restricción del tiempo de acceso al forraje es una herramienta que permite la utilización más eficiente de la misma evitando problemas por sobre-pastoreo y destrucción del forraje por pisoteo reduce los efectos negativos del ganado en la pradera (Chilibroste y col. 2007).

Son variables los efectos que se producen al reducir el tiempo de acceso a los alimentos. En nuestro país se ha observado que la producción de forraje durante el

período de otoño/invierno ha aumentado hasta un 30% realizando el cuidado de las pasturas a través de la restricción (Chilibroste y col. 2007). En los sistemas de producción lechera el ayuno es un manejo habitual, donde las vacas tienen períodos de ayuno, comida, rumia, descanso y movimiento hasta el próximo ordeño (Rook y col., 1994; Gibb y col. 1997). En Uruguay, las vacas lecheras tienen que recorrer hasta 3 km para llegar al ordeño donde tienen alto consumo de concentrados, luego sistemas de pastoreo y ayunos de hasta 5h/día (Chilibroste, 1999). La efectividad para compensar el consumo en vacas con acceso restringido a pasturas depende de que tan severa sea la restricción y de factores referidos a la dieta o al animal. Esta medida de manejo sumado a la suplementación mejora la producción lechera y minimiza la pérdida de peso corporal cuando las condiciones son adversas tanto en cantidad como en calidad de las pasturas (Chilibroste y col. 2007).

Se ha observado en diversos experimentos con vacas lecheras, que los animales sometidos a restricción de alimento no pudieron sostener el consumo de MS ni la producción de leche respecto a los animales con acceso continuo al alimento. Se registraron casos donde la reducción del tiempo de acceso al pastoreo de 8-9 a 4h, determinó una reducción del consumo de MS y de la producción de leche a pesar de haber aumentado la tasa de consumo (Kristensen y col., 2007; Pérez-Ramírez y col. 2008). Kristensen y col. (2007) trabajando con vacas lecheras de alta producción, sometidas a una restricción de 4, 6,5 y 9h de pastoreo por día, pudieron observar que los animales que pastorearon durante 4h tuvieron una menor producción de leche, grasa y proteína comparado con los de 9h y a su vez incrementaron la proporción de tiempo de pastoreo no alcanzando a compensar el consumo de pastura en los animales con restricción alimenticia. Por otro lado, Kennedy y col. (2011), en un experimento con vacas en lactancia temprana no encontraron diferencias en consumo de pasturas ni producción de leche como consecuencia de la restricción de la pastura, con tiempos de acceso a la pastura de 2 intervalos de 3 y 4,5h por día.

Aunque son escasos los estudios sobre animales alimentados sólo con pasturas, en un trabajo de Pérez-Ramírez y col. (2009) con vacas lecheras a pastoreo sin suplementación, las mismas fueron sometidas a una restricción en el tiempo de acceso al forraje de 1 sesión de 9h o 2 sesiones de 5,5h. Estos autores hallaron que los animales con restricción fueron incapaces de mantener el consumo de MS y la producción de leche cuando se los comparó con vacas sin restricción en el tiempo de acceso al forraje. Esto difiere de lo reportado por Chilibroste y col. (2007) quienes trabajando con vacas lecheras alimentadas con pastura mezcla de gramíneas y leguminosas, *Lotus corniculatus* y *Festuca arundinacea*, bajo 2 tiempos de acceso al alimento (16 vs 8 h/día) no encontraron diferencias ni en consumo ni en producción de leche.

Son más escasos los trabajos que evalúan el efecto de la restricción al alimento en bovinos de carne. Gekara y col. (2005) en su estudio realizado con bovinos de carne, los cuales fueron sometidos a 2 tratamientos de 12h vs 24h de acceso a las pasturas, demostraron que los animales con 12h de acceso al alimento

compensaron la restricción aumentando su tasa de consumo. En general el ganado adapta su comportamiento de pastoreo en prevención a eventos futuros, incluyendo los requerimientos de energía, por los que pueden hacerse hiperfágicos bajo determinadas condiciones (Baile y McLaughlin, 1987). Ginane y Petit (2005), trabajando con vaquillonas de carne pudieron observar una reducción del consumo de pasturas cuando se restringe de 24 a 5h diarias de acceso al alimento. Por otra parte, Gregorini y col. (2008) sometieron a vaquillonas a una restricción de 11h vs 4h diarias de acceso al forraje, pudiendo observar que no hubo diferencias en el consumo de MS o en la ganancia de peso. Vale resaltar que una moderada restricción del tiempo de pastoreo disponible puede no tener efecto en el consumo diario de forraje si la cantidad asignada no es limitante para lograr estrategias compensatorias de pastoreo como aumentar el tiempo que efectivamente dedican a comer y el tamaño del bocado (Gregorini y col. 2009).

Algunos trabajos realizados con ovinos estudiando el efecto de la restricción, reportaron que el consumo voluntario tuvo diferencias significativas a favor de los animales que tenían acceso a la pastura todo el día (24h) respecto de los que estaban bajo pastoreo restringido (11h), pero la tasa de consumo no varió según los diferentes tratamientos (Zuccari y col. 2007). Por otro lado, Pérez-Ruchel y col. (2012), observó que la restricción en el tiempo de acceso al forraje de 6h vs 24h por día generó una adaptación comportamental en los animales, aumentando su tasa de ingestión, aunque esta adaptación no fue suficiente para alcanzar el nivel de consumo de los animales durante todo el día. Según Vera y Vega (1986), los animales modifican su comportamiento ingestivo en respuesta a cambios en el tiempo disponible de pastoreo para poder mantener su nivel de consumo.

Si bien a nivel internacional existen algunos estudios referidos al tiempo de acceso a la pastura en bovinos, estos se basan principalmente en estudiar su efecto sobre el comportamiento ingestivo, la producción de leche y, en algunos casos, parámetros del ambiente ruminal encontrándose resultados opuestos. De allí es que surge la necesidad de ampliar la información acerca de los procesos digestivos de fermentación que ocurren cuando los animales son alimentados exclusivamente con pasturas templadas de alta calidad. Resulta de interés estudiar el impacto de la restricción de acceso a este tipo de alimento para contribuir a generar información relevante y aplicable a nuestros sistemas productivos, con el fin de establecer estrategias de alimentación de los rumiantes en sistemas pastoriles. La presente propuesta está orientada a evaluar la repercusión que tienen diferentes tiempos de acceso al alimento sobre la capacidad fermentativa del líquido ruminal. En este trabajo la pregunta que nos planteamos es ¿cuál es el efecto sobre la fermentación ruminal cuando se someten a los animales a distintos grados de restricción alimenticia?

FERMENTACIÓN *IN VITRO*

En el rumen la digestión de la fibra se da gracias a la presencia de mo y bajo determinadas condiciones de anaerobiosis, temperatura y humedad (Russell y Hespell, 1981) produciendo AGV, gases (CO₂ y CH₄ mayoritariamente) y células

microbianas. La producción de gas se produce de forma simultánea y es proporcional a la digestión de la fibra. Medir la generación del gas *in vitro* puede brindarnos información cuantitativa de la velocidad y el grado de digestión de los sustratos (Schofield y col. 1994).

La técnica de producción de gas *in vitro* fue desarrollada y usada para poder estudiar la cinética de los procesos de fermentación microbiana en el tracto digestivo (López y col. 2007), y poder evaluar de forma más rápida y económica los alimentos para rumiantes (Britos, 2012). La misma se basa en que el gas producido en recipientes de cultivo está en correlación con la cantidad de sustrato fermentado y requiere de un inóculo proveniente del rumen o del tracto digestivo (Mould y col. 2005). Las principales ventajas de las técnicas *in vitro* están dadas por el bienestar animal, tamaño de la muestra necesaria, el costo y la descripción de la cinética de fermentación (Magallanes L, 2012). Otra de sus ventajas es que se puede automatizar con el fin de obtener un gran número de datos que permiten la estimación de parámetros más exactos que los métodos *in situ* (Huhtanen y col. 2008).

Existen diversos trabajos nacionales e internacionales que utilizaron esta técnica con diferentes propósitos. Trei y col. (1970) para ver el efecto de la suplementación, quien reporta que la utilización de líquido ruminal de animales que consumen heno produce menos gas que usando líquidos ruminales de animales suplementados con cebada o suplementados con sorgo. Se han empleado a su vez para evaluar niveles de suplementación o comparar diferentes sustratos. Algunos autores como Calabró y col. (2008) estudiaron la cinética de fermentación comparando ensilajes secos y ensilajes frescos. Por otra parte, otros autores estudiaron las cinéticas de fermentación de forrajes tropicales a distintos pH iniciales (Kozloski y col. 2008). Generalmente estas técnicas se aplican para evaluar alimentos y son pocos los trabajos que las utilizan para comparar inóculos ruminales de animales sometidos a diferentes tratamientos. Los pocos trabajos que comparan inóculos lo han hecho con el objetivo de compararlos entre especies, cabras y ovejas (Ammar y col. 2008), bovinos y ovinos (Bueno y col. 2005). En Uruguay, Britos (2012), evaluó los inóculos de terneras alimentadas con ensilaje de pastura de buena calidad utilizando como sustrato forraje o concentrado, por otro lado, Pérez-Ruchel (2010), evaluó el efecto del inóculo ruminal de ovinos alimentados únicamente con forraje fresco con tiempos de acceso (6 o 24h por día) y encontró una mayor actividad fermentativa ruminal en los animales sin restricción.

Es importante destacar que los datos obtenidos a partir de los experimentos *in vitro* no siempre se pueden comparar entre sí a causa de los múltiples factores de variación que pueden afectar a la técnica. El inóculo es la principal variación en la medición de la producción de gas *in vitro*, pero a causa de las variaciones del líquido ruminal a lo largo del día, algunos factores como la extracción del inóculo o las proporciones en que se utilizan pueden incidir en este tipo de mediciones (Bueno y col. 2005). El momento de la extracción del inóculo vinculado a la dinámica de ingestión, es un factor que puede influir en los resultados obtenidos, por lo tanto es

importante asegurarse de que la actividad microbiana sea elevada y que no limite la fermentación (Rymer y col. 2005).

Por otro lado, las pruebas de digestibilidad *in vitro* han sido desarrolladas desde los años sesenta (Tilley y Terry, 1963) y simulan la digestibilidad del tracto digestivo de los rumiantes. Se utiliza principalmente para predecir digestibilidad y como una herramienta de selección para mejorar la calidad nutricional de los forrajes. Aunque las determinaciones de la digestibilidad *in vivo* total son consideradas las más exactas, requieren de cantidades de alimento a ofrecer diariamente, mano de obra e instalaciones, además de ser costosas y laboriosas.

En dietas basadas en el consumo de forrajes, la digestibilidad *in vivo* es afectada por aquellos elementos que tienen efecto sobre el consumo, como la capacidad de selección del animal en función de la oferta de material, la disponibilidad de agua, la tasa de pasaje del alimento, la eficiencia metabólica de los animales y hasta las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa), lo que trae como consecuencia, que difícilmente la técnica *in vitro* pueda reproducir las transformaciones ocurridas en la digestibilidad *in vivo* (Cochran y col. 1986). Aún cuando la digestibilidad aparente, constituye una expresión muy simplificada del valor nutritivo, los datos que se generan de esta determinación son de gran utilidad (Merchen, 1993).

El sistema de digestibilidad *in vitro* está constituido por un equipo en donde el contenido ruminal y forraje en estudio son sometidos a procesos de incubación bajo condiciones ambientales controlables con el objeto de predecir los procesos digestivos obtenidos en el animal, digestibilidad *in vivo* (Fuller, 2004).

El método de Tilley y Terry (1963) se considera un método referente para calcular la digestibilidad en alimentos para rumiantes, el cual ha sido modificado y adaptado según el tipo de alimento a analizar, al igual que se han desarrollado y probado diferentes tampones de dilución para ajustar el pH del inóculo. Pese a su exactitud y a todas las modificaciones y adaptaciones, este método sigue siendo un procedimiento que consume mucho tiempo y trabajo, además cada alimento debe incubarse por separado, limitando el número de muestras a ser analizadas por corrida o tanda. La búsqueda para hacer más eficiente, rápido y económico el proceso para estimar la digestibilidad, ha llevado al desarrollo del método *in vitro* de Goering y Van Soest (1970), usando el equipo Daisy- Ankom Technology, que permite la incubación simultánea de hasta 100 muestras diferentes, distribuidas en cuatro jarras (recipiente de vidrio de 4 lts de capacidad), mantiene el calor uniforme y la agitación constante durante el procedimiento de incubación. Con este método, el material que desaparece de las bolsas durante la incubación es considerado digerible. Es un método rápido, seguro, eficiente y económico y los datos obtenidos de digestibilidad para distintos alimentos, tienen una alta correlación con los obtenidos por el método convencional de Tilley y Terry (1963).

HIPÓTESIS

La restricción en el tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad disminuye la actividad fermentativa del inóculo ruminal de las terneras.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar cómo influye el tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad, en la actividad fermentativa del líquido ruminal en terneras consumiendo pasturas templadas de alta calidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la forma en que la restricción del tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad afecta:

- La capacidad de fermentación *in vitro* del inóculo ruminal en terneras de carne medida a través de la técnica de producción de gas *in vitro*
- La actividad del líquido ruminal medida a través de la digestibilidad verdadera *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Campo Experimental N°2 de Facultad de Veterinaria, en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal de los Departamentos de Bovinos y Nutrición Animal, (Libertad, 34° latitud Sur y 56° longitud Oeste). Todos los análisis se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria y en el Laboratorio de Nutrición del Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria. Los procedimientos con animales, se realizaron siguiendo los protocolos aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A), de la UdelaR, Uruguay.

ANIMALES Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 24 terneras cruce Hereford x Angus de $10,1 \pm 0,3$ meses de edad, y $153,1 \pm 18,1$ kg de PV, con catéter a nivel ruminal y alojadas en forma individual en jaulas metabólicas. Los animales se agruparon por PV en 6 bloques y dentro de cada bloque fueron distribuidos entre 4 tratamientos, de acuerdo a un diseño de bloques completos al azar. El período experimental fue de 23 días con un período de 15 días de adaptación de los animales a la dieta y a las instalaciones, seguido de un período de mediciones de 8 días. Previo al período de mediciones se le implantó a todos los animales (bajo anestesia local), un catéter a nivel de rumen para la posterior colecta de líquido ruminal.

TRATAMIENTOS

Los tratamientos fueron los siguientes:

- T4: pastura fresca suministrada cortada a voluntad durante 4 horas diarias;
- T6: pastura fresca suministrada cortada a voluntad durante 6 horas diarias;
- T8: pastura fresca suministrada cortada a voluntad durante 8 horas diarias;
- T24 o control: pastura fresca suministrada cortada a voluntad durante 24 horas diarias.

ALIMENTOS Y MANEJO

Durante el experimento los animales fueron alojados en jaulas metabólicas, donde tuvieron libre acceso al agua. Se seleccionó una parcela de pradera de primer año, en estado vegetativo compuesto por trébol blanco (*Trifolium repens*) y raigrás (*Lolium multiflorum*) (64% de leguminosas y 36% de gramíneas), y con una disponibilidad inicial de 2705 kg MS/ha cuya composición química se puede observar en el Cuadro I. La pastura fue cortada diariamente a 10 cm del suelo con una segadora de discos y suministrada el mismo día a los animales sin restricción de cantidad y como único alimento a los animales. Fue ofrecida individualmente y sin restricción de cantidad durante el tiempo establecido para cada tratamiento, a partir de las 08:00 h (hora 0), mediante la reposición continua del alimento. El sobrante de cada día se desechó al día siguiente previo a la hora 0 de alimentación.

Para cada animal, se evaluó la actividad fermentativa del líquido ruminal de los animales sometidos a cada tratamiento, mediante la evaluación de la producción de gas *in vitro* y la DVIV de una colección de alimentos y de la pastura administrada a los animales del experimento (Cuadro I y II).

Cuadro I. Composición química promedio de la pastura (% en base seca) utilizada durante el período experimental.

MS	MO	FND	FAD	PB
15,3	88,2	48,2	26,2	19,1

MEDICIONES Y CÁLCULOS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL INÓCULO *IN VITRO*

Se evaluó la actividad del inóculo ruminal mediante dos técnicas *in vitro*:

1. Producción de gas, utilizando 4 alimentos diferentes como sustratos (alfalfa, heno de moha, ensilaje de planta entera de sorgo (Cuadro II) y la pastura del experimento administrada a los animales (Cuadro I)).
2. DVIV de forrajes de leguminosas y de gramíneas, henos y ensilajes de sorgo y de maíz (Cuadro II) y de la pastura del experimento suministrada los animales (Cuadro I).

Producción de gas *in vitro*

Se determinó la producción de gas utilizando como inóculo el líquido ruminal fresco tomado de cada una de las terneras a la hora 2 desde el inicio de la ingesta y como sustratos 4 alimentos; Pastura del experimento, alfalfa, heno de moha y ensilaje de sorgo (planta entera), cuya composición química se puede observar en el cuadro II. Se determinó la producción de gas de acuerdo a la técnica descrita por Theodorou y col. (1994).

Se emplearon frascos de vidrio con capacidad de 125 mL a los cuales se adicionaron 0,5 g de sustrato seco y molido a 1 mm. El día previo a la incubación se agregó a cada frasco de fermentación 38 mL de solución basal, 2 mL de solución tampón y 0,5 mL de solución reductora, de acuerdo a Williams y col. (2005), Se emplearon 4 frascos con cada sustrato y tres frascos blanco por animal conteniendo sólo el medio de incubación e inóculo (en total 96 frascos con sustrato + 72 frascos como blancos). Mediante una corriente de CO₂ se saturaron los frascos, se taparon inmediatamente con tapones de goma y permanecieron a 4°C por 12h antes de la inoculación con el fin de hidratar el sustrato con el medio. Previo a la inoculación, los frascos se colocaron en un baño maría a 39 °C y se inocularon 10 mL de líquido ruminal recién extraído. Durante el procedimiento se volvió a saturar el frasco con una corriente de CO₂, para luego sellarlos herméticamente con precinto de aluminio.

Los frascos fueron colocados nuevamente en el baño maría donde permanecieron durante todo el período de incubación. La presión de gas producido por fermentación en cada frasco se registró luego de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96h de incubación, utilizando un medidor de presión con transductor (RZ-68601-00, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) y una aguja hipodérmica de 0,6 mm. Luego de cada medición el gas fue liberado por completo con una aguja hipodérmica. Los datos de presión de gas registrados (expresados en psi) fueron transformados a volumen (V) mediante una ecuación de predicción obtenida en un experimento previo, realizado en similares condiciones:

$$V \text{ (mL)} = 4,40 P \text{ (psi)} + 0,09 P^2 \text{ (psi)}$$

Al gas generado por cada frasco en cada medición se le restó el producido por los blancos. A fin de estimar la evolución de la fermentación, el volumen de gas producido se expresó como mL de gas producido por g de MS incubada (Msi).

DVIV

Se determinó la DVIV para evaluar la actividad del inóculo frente a los diferentes sustratos (8 alimentos diferentes, Cuadro II), y de la pastura administrada a los animales (Cuadro I). Se utilizó como inóculo una mezcla de líquido ruminal por tratamiento, compuesta por el líquido ruminal de cada uno de los animales sometidos a cada tratamiento. Se procedió a la extracción del inóculo, a la hora 2 en relación al inicio de la ingesta, se tomaron 67 mL de líquido ruminal de cada uno de los animales de cada tratamiento y se mezclaron para obtener un volumen final de 400 mL por tratamiento. Se adicionó una solución buffer y se incubó inmediatamente a 39°C con 0,5 g de cada sustrato (secado y molido a 1 mm) por duplicado en bolsas porosas (porosidad 30×10^{-3} , F57 Ankom Tech. Corp.) en un equipo DAISY® (Ankom Technology Corp. Fairport, NY, USA). Luego de 48h de incubación, las bolsas fueron lavadas con agua corriente y luego tratadas durante 1 h a 100°C con una solución detergente neutro en un analizador de fibra Ankom 220 (Ankom Technology Corp., NY, USA) y secadas en un horno a 105°C hasta peso constante. La DVIV de cada alimento incubado fue calculada como el porcentaje de material desaparecido de las bolsas luego de la incubación y lavado de en solución neutro detergente. El procedimiento se repitió en 2 tandas consecutivas.

Cuadro II. Composición química (% en base seca) de los alimentos de la colección utilizados para pruebas de DVIV

Alimento	MS	FND	FAD	PB
Lotus *	29,8	44,4	28,5	12,8
Avena *	14,7	49,9	26,8	14,4
Alfalfa*	23,7	30,0	16,0	18,2
Ensilaje sorgo PE**	30,0	56,3	29,0	4,2
Ensilaje maíz PE	32,2	33,9	17,3	6,9
Heno de moha	86,6	71	36,4	3,3
Henolaje alfalfa y cebada	42,2	61,1	37,6	8,3
Heno alfalfa	85,9	49,3	32,7	20,3

*Pasturas en estado vegetativo, ** PE: planta entera

ANÁLISIS QUÍMICOS

Todas las muestras de alimento fueron secadas en estufa a 60° C y molidas a través de una malla de 1mm previo a su análisis químico. Los contenidos en MS, MO y PB (N x 6.25) fueron analizados según A.O.A.C. (1990). Los contenidos de FDN y FDA fueron analizados de acuerdo a Robertson y Van Soest (1981), utilizando un analizador de fibra ANKOM (ANKOM Technology Corporation, Fairport, Nueva York, EE.UU.). Todas las muestras se analizaron por triplicado, aceptando coeficientes de variación entre análisis del 3 al 5% según el parámetro.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron de acuerdo a un diseño de bloques completos al azar. El efecto de la restricción en el tiempo de acceso a la pastura se analizó utilizando el modelo mixto (Proc. mixed del SAS).

para los datos de DVIV el modelo utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$$

Donde μ es la media general, T_i es el efecto fijo del tratamiento, B_j el efecto fijo del bloque, y e_{ij} es el error residual.

Para variables con medidas repetidas en el tiempo, producción de gas in vitro se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + H_j + (TxH)_{ij} + A_k + e_{ijk}$$

Donde μ es la media general, T_i es el efecto fijo del tratamiento, H_j es el efecto fijo de la hora, $(TxH)_{ij}$ el efecto fijo de la interacción tratamiento x hora, A_k el efecto aleatorio del animal y e_{ijk} es el error residual.

Las medias de todos los parámetros fueron comparadas mediante el test de Tukey. Se aceptaron como diferencias significativas valores de $P \leq 0,05$ y como tendencia valores de P mayores a 0,05 y menores a 0,1.

RESULTADOS

PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*

La actividad fermentativa se comportó diferente según el sustrato utilizado. Cuando se utilizó el sustrato pradera (pastura utilizada en el experimento) el inóculo proveniente de los animales que presentaron un acceso continuo al forraje (T24) tuvieron una mayor capacidad de fermentación ruminal que los animales con restricción al forraje ($P=0,048$). No se encontraron diferencias en la capacidad de fermentación frente los demás sustratos (Alfalfa, Heno y Ensilaje), y tampoco se observaron interacciones entre inóculo y sustrato como se puede observar en el Cuadro III.

Cuadro III. Volumen de gas acumulado (mL/g MS incubada) hasta la hora 96 de incubación *in vitro* para los diferentes sustratos, utilizando como inóculo el líquido ruminal de terneras alimentadas con 5 forraje fresco con diferente tiempo de acceso al alimento: 4, 6, 8 o 24 h/día (T4, T6, T8 y T24 respectivamente)

	Tratamiento				EEM	P		
	T4	T6	T8	T24		T	H	T*H
Pradera	166 ^d	195 ^c	219 ^b	245 ^a	18,99	0,048	<0,001	0,998
Alfalfa	145	150	143	152	4,60	0,538	<0,001	0,509
Heno	114	131	146	143	23,85	0,221	<0,001	0,282
Silo	83	102	84	84	8,89	0,370	<0,001	0,732

($n=24$ por tratamiento), T: efecto del tratamiento; H: efecto de la hora T*H: efecto de la interacción T*H.

DVIV

En cuanto a la DVIV de los sustratos utilizando como inóculo líquido ruminal de los animales sometidos a los distintos tratamientos se observó una tendencia ($P= 0,083$) a una mayor actividad digestiva en el inóculo de las terneras sin restricción al forraje. No se observaron interacciones entre inóculo y sustrato como muestra el cuadro IV.

Cuadro IV. DVIV de diferentes alimentos utilizando como inóculo el líquido ruminal de terneras alimentadas con forraje fresco durante todo el día (T24), durante 8h (T8) 6h (T6) o 4h (T4)

	Tratamiento				EEM	P		
	T4	T6	T8	T24		T	S	T*S
% DVIV	60,9 ^y	60,5 ^x	61,0 ^{xy}	62,7 ^x	1,46	0,083	<0,001	0,776

T: efecto del tratamiento, S: efecto del sustrato, T x S: interacción entre T y S.

DISCUSIÓN

Cuando se evaluó la capacidad de fermentación del inóculo ruminal mediante la técnica de producción de gas se observó un comportamiento diferente según el sustrato utilizado. Detectamos una mayor producción de gas para el sustrato pradera del experimento en los animales sin restricción al forraje (T24) respecto a los grupos restringidos. Los animales fueron adaptados durante 15 días con esa misma pastura que generó mayor producción de gas, esto podría explicar porque el ambiente ruminal de estos animales tiene adaptada su microbiota para degradar dicho sustrato, pudiendo tal vez presentar mayores proporciones de mo capaces de degradarlo. De todos modos las restricciones casi no afectaron el inóculo y por lo tanto la actividad fermentativa fue similar entre los tratamientos. Pérez-Ruchel y col. (2014), evaluando dos tiempos de acceso a una pastura (24 y 6 h/día), reportaron una mayor actividad microbiana *in vitro* en ovinos alimentados durante todo el día, lo que puede atribuirse a que su flora estaba adaptada y posiblemente tengan más mo capaces de degradarlos.

Al limitar el tiempo de acceso a las pasturas lleva a que aumente el período de ayuno, lo que hace que cuando el mismo finalice los animales ingieran el alimento ofrecido con mayor voracidad, aumentando sus tasas de consumo (Forbes y Mayes, 2002). Éste ritmo acelerado de ingestión de MS que puede fermentar en rumen puede llevar a altas producciones de AGV, lo que genera una disminución del pH ruminal (Cajarville y Repetto, 2005). Esto sería más evidente cuando se utilizan pasturas templadas de alta calidad. Por ejemplo ha sido reportado por Cajarville y Repetto (2005) con pasturas templadas de alta calidad, similares a las usadas en este experimento, que éstas presentan alto contenido de MO fermentescible, lo cual se puede relacionar a las altas producciones de gas cuando éstas son puestas a fermentar *in vitro* (Antúnez y Caramelli, 2009). Ésta característica del forraje modificaría el ambiente ruminal disminuyendo el pH del mismo y en estas condiciones se vería afectada la degradación de la fibra. Según Cardoso y col. (2000) la degradabilidad de FND disminuye cuando el pH es inferior a 6,2. Sin embargo, los datos de pH reportados por Félix y col. (2017) quienes trabajaron con estos mismos animales y tratamientos indican que éste se mantuvo por encima de los niveles óptimos, lo que no sería una limitante para la degradación de la fibra. Kolver y de Veth (2002) afirman que la fermentación ruminal podría ser mantenida a pesar de las variaciones de pH ruminal, si éste se mantiene en niveles óptimos (5,68 a 6,61) durante la mayor proporción del día y así permitir el ataque o acceso microbiano y la digestión. Por otro lado, una alta frecuencia de alimentación reduciría las fluctuaciones en el ambiente ruminal posterior a la ingesta, lo que promovería una mayor eficiencia de fermentación (Castro y col., 2002; Freer y col. 2007).

Cuando se evaluó el potencial de digestión mediante DVIV utilizando diferentes sustratos, el líquido ruminal de los animales sin restricción al forraje tendió a mostrar una mayor capacidad de digestión. En cambio en los resultados reportados por Pérez-Ruchel y col. (2012) quienes evaluaron dos tiempos de acceso diferentes (6h vs 24h), no encontraron diferencias en la digestibilidad *in vivo* de las distintas fracciones del alimento. Por otro lado, Huhtanen y col. (2007) trabajando con novillos

alimentados con heno (2 vs 18 veces/día) también registró que la frecuencia de alimentación no afectaba la digestibilidad de la dieta. En nuestro trabajo los animales sin restricción tuvieron una tendencia a mayor digestión de la fibra que los sometidos a restricciones severas. No obstante, no se vio reflejada esta tendencia en la digestibilidad *in vivo* de las fracciones MO, FND, FAD reportadas por Félix y col. (2017) para estos mismos animales y tratamientos. En parte esto podría explicarse porque en la DVIV se utiliza un pool de líquidos ruminales de los animales sometidos a los distintos tratamientos.

La digestibilidad de la dieta por parte del rumiante depende, entre otros factores, de la cinética ruminal (Mertens y Ely, 1979). Según Colucci y col. (1982) a medida que aumenta el consumo del rumiante, la velocidad de pasaje de los alimentos por el tracto digestivo también aumenta, resultando en una menor digestibilidad de los nutrientes. En nuestro trabajo, los resultados de consumo fueron mayores para los animales alimentados todo el día (2031; 2686; 2866 y 3492 g de MS para los grupos T4, T6, T8 y T24 respectivamente) presentando a su vez menores tasas de consumo para el grupo sin restricción (510; 540; 518 y 371 g de MS/h para los grupos T4, T6, T8 y T24 respectivamente) (Félix y col. 2017). Pérez-Ruchel y col. (2012) estudiando la cinética de pasaje en ovinos reportaron que los animales con restricción al consumo presentaron una mayor tasa de pasaje por el tracto digestivo y menor tiempo de retención de la ingesta en el retículo-rumen respecto a los no restringidos, sin embargo la digestibilidad de la dieta no presentó variación. Según Ellis y col. (2000), al disminuir el tiempo de retención de la ingesta en el tubo digestivo disminuiría la digestibilidad de alimento ya que dificultaría la colonización microbiana de las partículas y/o la tasa de hidrólisis de las mismas.

Con la *técnica in vitro* utilizada en nuestro trabajo, la cinética ruminal no es un factor que afecte la digestibilidad, pero si tomamos en cuenta el inóculo por tratamiento que utilizamos el número de flora celulolítica presente si puede variar, lo cual puede influir en la tendencia a una mayor DVIV que fue observada en los animales sin restricción (T24). Sumado a esto es importante destacar los altos niveles de digestibilidad para los diferentes nutrientes, los cuales superaron el 70 y el 80 % para la MS y MO respectivamente, Kolver y de Veth (2002) afirman que las pasturas de alta calidad como las usadas en este experimento se degradan de forma bastante extensa y rápida a nivel ruminal.

En el presente trabajo se esperaba que la restricción en el tiempo de acceso al forraje produjera alteraciones en el ecosistema ruminal, como disminución del pH, alterando la actividad de su microbiota y en consecuencia disminuyera la digestibilidad del forraje. Se observaron variaciones de pH únicamente en los animales restringidos, en cambio para los animales sin restricción, el pH fue más estable a lo largo de todo el día, Sin embargo, se registraron valores de pH en promedio por encima de los óptimos durante la mayor parte del día, (6,70; 6,64; 6,47; 6,30 para los grupos T4, T6, T8 y T24 respectivamente) (Félix y col. 2017). La tendencia a una mayor digestibilidad *in vitro* en los T24 pudo atribuirse al mayor

número de mo celulolíticos presentes en el inóculo de dichos animales, posiblemente el pH se mantuvo a lo largo de las 48h de incubación y la caída de esa población microbiana fue más demorada respecto a los otros tratamientos, facilitando la degradación de la fibra. Hubiese sido de interés realizar el estudio de poblaciones microbianas para aportar más información a este trabajo.

CONCLUSIONES

Restringir el tiempo de acceso a un forraje fresco de alta calidad provocó una menor actividad fermentativa al ser medida a través de la técnica de producción de gas in vitro. Sin embargo, solamente cuando se utilizó el mismo forraje que habían consumido los animales donantes como sustrato se detectaron aumentos en la fermentación ruminal.

Al evaluar la digestibilidad in vitro del inóculo se observó una tendencia a mayor actividad digestiva en el inóculo de las terneras sin restricción al forraje.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ammar H, López S, Andrés S, Ranilla M J, Bodas R, González J S (2008). In vitro digestibility and fermentation kinetics of some browse plants using sheep or goat ruminal fluid as the source of inoculums. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147: 90-104.
2. Antúnez M, Caramelli A (2009). Variación en la composición química y producción de gas in vitro de pasturas de acuerdo al horario de corte. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria, UdelaR, 43 p.
3. Araujo F O, Vergara L J (2007). Propiedades físicas y químicas del rumen. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15 (Supl 1): 34-38.
4. A O A C (1990). Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of analysis. 15^a ed. AOAC, Arlington VA. Disponible en: https://archive.org/stream/gov.law.aoac.methods.1.1990/aoac.methods.1.1990_djvu.txt Fecha de consulta: 16 /11/17.
5. Baile C, McLaughlin C (1987). Mechanisms controlling feed intake in ruminants: A review. *J. Anim. Sci.*, 64: 915-922.
6. Britos A. (2012). Suplementación de forrajes de alta calidad con diferentes tipos de concentrados: efecto sobre la fermentación ruminal. Tesis. UdelaR, 38 p.
7. Bueno I C S, Filho S L S, Gobbo S P, Louvandini H, Vitti D M S S, Abdalla A.L. (2005). Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124: 95–105.
8. Cajarville C, Repetto J L (2005). Uso de concentrados para optimizar el aprovechamiento digestivo de las pasturas. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp.121-128.
9. Cajarville C, Pérez A, Aguerre M, Britos A, Repetto J L (2006a). Effect of the timing of cut on ruminal environment of lambs consuming temperate pastures. *J. Anim. Sci.* 84 / *J. Dairy Sci.* 89: 103.
10. Cajarville C, Aguerre M, Britos A, Tebot I, Pérez A, Elizondo V, Repetto J L (2006b) Effect of feeding frequency of fresh forage on ruminal pH: data review. XIV International Symposium Lameness in Ruminant, Uruguay-Colonia, 7-11 Noviembre, 2006, p 96.
11. Cajarville C, Aguerre M, Repetto J (2006c). Rumen pH, NH₃-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim. Res.* 55: 511-520.

12. Cajarville C, Mendoza A, Santana A, Repetto J L (2012). En tiempos de intensificación productiva. ¿Cuánto avanzamos en el conocimiento de los nuevos sistemas de alimentación de la vaca lechera? *Veterinaria*. 48 (Suppl 1): 35-39.
13. Calabro S, Moniello G, Piccolo V, Bovera F, Infascelli F, Tudisco R, Cutrignelli M I (2008). Rumen fermentation and degradability in buffalo and cattle using the in vitro gas production technique. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 92: 356–362
14. Cardoso R C, Valadares Filho S C, Coelho da Silva J F, Paulino M F, Valadares R F D, Cecon P R, Costa M A L, Oliveira R V. (2000). Síntese microbiana, pH e concentração de amônia ruminal e balanço de compostos nitrogenados, em novilhos F1 Limousin x Nelore. *Rev Bras de Zootec*, 29:1844-1852.
15. Castro T, Manso T, Mantecón A R, Carro M D (2002). Effect of either once or twice daily concentrate supplementation of wheat straw on voluntary intake and digestion in sheep. *Small Rum. Res*. 46:43-50.
16. Colucci P E, Chase L E, Van Soest P J (1982). Feed intake, apparent diet digestibility, and rate of particulate passage in dairy cattle. *J. Dairy Sci*. 65:1445.
17. Cochran R C, Adams D C, Wallace J D, Galyean M L (1986). Predicting digestibility of different diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. *J. Anim. Sci*. 63:1476 -1483.
18. Chilibroste P. (1999). Grazing time: the missing link. A study of the plant animal interface by integration of experimental and modelling approaches. PhD thesis Agricultural University, Wageningen, 191 pp.
19. Chilibroste P. (2002). Evaluación de modelos detallados de rumen para predecir disponibilidad de nutrientes en sistemas intensivos de producción de leche bajo pastoreo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*. 10 (3): 232-240.
20. Chilibroste P, Soca P, Mattiauda D A, Bentancur O, Robinson P H (2007). Short term fasting as a tool to design effective grazing strategies for lactating dairy cattle: a review. *Aust. J. Exp. Agric*. 47:1075–1084.
21. Demment M W, Peyraud, J L, Laca, E A (1995). Herbage intake at grazing: a modelling approach. Disponible en: *Recent developments in the nutrition of herbivores*. INRA Editions, Clermont-Ferrand, Paris, France, pp. 121-141.
22. Dewhurst R J, Davues D R, Merry R J (2000). Microbial protein supply from the rumen. *Anim. Feed Sci. Tech.*; 85:1-21.
23. Dixon R M, Stockdale C R (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Aust J Agric Res* 50:757-773.

24. Edwards J E, Huws S A, Kim E J, Lee M R F, Kingston-Smith A H, Scollan N D (2008). Advances in microbial ecosystem concepts and their consequences for ruminant agriculture. *Animal* 2(5):653-660.
25. Ellis W C, Poppi D, Matis J H (2000). Feed intake in ruminants: Kinetics aspects. En: D`Mello J.P.F. (Eds.), *Farm animal metabolism and nutrition*, Wallingford, CAB International, p. 335-382.
26. Félix A, Repetto J L, Hernández N, Pérez-Ruchel A, Cajarville C (2017). Restricting the time of access to fresh forage reduces intake and energy balance but does not affect the digestive utilization of nutrients in beef heifers. *Anim. Feed Sci. Tech.* 226: 103-112.
27. France J, Dijkstra J (2005). Volatile fatty acid production. En: Dijkstra J, Forbes JM, France J. *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. 2a Ed. Wallingford, CAB International Publishing, p.157-176.
28. Freer M, Dove H, Nolan J V (2007). Application. En: *Nutrient requirements of domesticated ruminants*, Collingwood, CSIRO, p.227-233.
29. Forbes J M, Mayes R W (2002). Food choice. En: Freer M, Dove H. (Eds), *Sheep nutrition*, Wallingford, CAB International, p: 51-69.
30. Fuller M. (2004). *The encyclopedia of farm animal nutrition*. Wallingford, CABI Publishing, p 36.
31. Gekara O J, Prigge E C, Bryan W B, Nestor E L, Seidel G (2005). Influence of sward height, daily timing of concentrate supplementation, and restricted time for grazing on forage utilization by lactating beef cows. *J. Dairy Sci.* 83:1435-1444.
32. Gibb M J, Huckle, C A, Nuthall R, Rook, A J (1997). Effect of sward surface height on intake and grazing behaviour by lactating Holstein-Friesian cows. *Grass and Forage Science*, 52: 309-321.
33. Ginane C, Petit M (2005). Constraining the time available to graze reinforces heifers preference for sward of high quality despite low availability. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 94: 1-14.
34. Goering H, Van Soest P (1970). Forage Fiber Analyses. (Apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agricultural Handbook*. N°379. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. Disponible en: <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT87209099/PDF> Fecha de consulta: 16/11/17.
35. Gregorini P, Gunter S A, Beck P A (2008). Matching plant and animal processes to alter nutrient supply in strip-grazed cattle: Timing of herbage and fasting allocation. *J. Anim. Sci.* 86: 1006-1020.

36. Gregorini P, Clark C E F, Jago J G, Glassey CB, McLeod K L M, Romera J (2009). Restricting time at pasture: Effects on dairy cow herbage intake, foraging behavior, hunger-related hormones, and metabolite concentration during the first grazing session. *J. Dairy Sci.* 92: 4572-4579.
37. Griggs T C, MacAdam J W, Mayland H F, Burns J (2005). Nonstructural carbohydrate and digestibility patterns in Orchardgrass swards during daily defoliation sequences initiated in evening and morning. *Crop. Sci.* 45: 1295-1304.
38. Hodgson J. (1990). *Grazing management; science into practice.* Longman Scientific and Technical. New York, USA, Longman, 203 p.
39. Hoover W H, Miller T K (1996). Contributions of microbial protein to amino acid supply. En: *Proceeding of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers.* Rochester, NY, USA; p. 199-206.
40. Huhtanen P, Asikainen U, Arkkila M, Jaakkola S (2007). Cell wall digestion and passage kinetics estimated by marker and in situ methods or by rumen evacuations in cattle fed hay 2 or 18 times daily. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133:206-227.
41. Jensen P y Toates F M (1993). Who needs 'behavioural needs'? Motivational aspects of the needs of animals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 37:161-181.
42. Kennedy E, Curran J, Mayes B, McEvoy M, Murphy JP, O'Donovan M (2011). Restricting dairy cow access time to pasture in early lactation: the effects on milk production, grazing behaviour and dry matter intake. *Anim.* 5:1805-1813.
43. Kolver E S y De Veth M J (2002). Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. *J. Dairy Sci.* 85:1255-1266.
44. Kozloski G, Lima L D, Cadorin J r R L Jr, Bonnacarrere Sanchez L M, Senger C C D Fiorentini G, Harter C J (2008). Microbial colonization and degradation of forage samples incubated in vitro at different initial pH. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141: 356–367.
45. Kristensen Oudshoorn F, Munksgaard L, Søegaard K (2007). Effect of time at pasture combined with restricted indoor feeding on production and behavior in dairy cows. *Animal* 1:439-448.
46. López S, Dhanoab M S, Dijkstra J, Bannink A, Kebreab E, France J (2007). Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135: 139–156.

47. Lovett G M, Canham C D, Arthur M A, Weathers K C, Fitzhugh R D (2006). Forest ecosystem responses to exotic pests and pathogens in eastern North America. *Bio Sci.* 56: 395-405.
48. Magallanes L. (2012). Evaluación de la actividad del líquido ruminal de vaquillonas alimentadas con ensilaje de pastura y suplementadas con diferentes concentrados energéticos mediante la producción de gas in vitro. Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria. UdelaR, 30p.
49. Mayland H, Mertens D, Taylor B, Burns J, Fisher D, Gregorini P, Ciavarella T, Smith K, Shewmaker G, Griggs T (2005). Diurnal changes in forage quality and their effects on animal preference, intake, and performance. 51. Proceedings of the 35th California Alfalfa y Forage Symposium, Visalia, CA, USA, pp.: 223–230.
50. Mc Sweeney C S, Denman S E, Roderick I, Mackie R I (2005). Rumen bacteria. En: *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants.* 52. Dordrecht, Springer, p 23–37.
51. Merchen N. (1993). Digestión, absorción y excreción en los rumiantes. En: D. C. Church (Ed.) *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición.* 53. Editorial Acribia, Zaragoza, V1, p. 191 - 223.
52. Mertens D R, Ely L O (1979). A dynamic model of fiber digestion and passage in the ruminant for evaluating forage quality. *J Anim Sci* 49:1085–1095.
53. Mould F L, Kliem K E, Morgan R, Mauricio R M (2005). In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim Feed Sci Technol.* 123–124:31–50.
54. Pereira D H, Gomes O, Ceolin da Silva B, Leão M I, Valadares Filho S, Martins F H, Garcia R (2007). Intake and total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) silage and concentrate in different ratios. *Livest. Sci.* 107: 53-61.
55. Pérez-Ramírez E, Delagarde R, Delaby L (2008). Herbage intake and behavioural adaptation of grazing dairy cows by restricting time at pasture under two feeding regimes. *J. Dairy Sci.* 91:1384-1392.
56. Pérez-Ramírez E, Peyraud J L and Delagarde R (2009) Restricting daily time at pasture at low and high pasture allowance: Effects on pasture intake and behavioral adaptation of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2: 3331-3340.
57. Pérez-Ruchel A. (2006). pH, Amoníaco, Ácidos Grasos Volátiles y Producción de Proteína Microbiana en el Rumen de Corderos, según el Horario de Corte de la Pastura Consumida. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 36p.

58. Pérez-Ruchel 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. Facultad de Veterinaria. UdelaR. 53 p.
59. Pérez-Ruchel A, Repetto JL, Cajarville C (2012). Suitability of live yeast addition to alleviate the adverse effects due to the restriction of the time of access to feed in sheep fed only pasture. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97:1043-1050.
60. Pérez-Ruchel A, Repetto J L, Fraga M, Perelmutter K, Zunino P, Cajarville C (2014). La restricción en el tiempo de acceso al forraje en ovinos alimentados con pastura de buena calidad afecta algunos grupos microbianos. *Veterinaria (Montevideo)* 50(94):22-33.
61. Relling A E, Mattioli G A (2003). *Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes*. La Plata, EDULP, 71 p.
62. Repetto J L, Cajarville C (2009). ¿Es posible lograr la sincronización de nutrientes en sistemas pastoriles intensivos? XXXVII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p: 60-67.
63. Rook A J, Huckle C A, and Penning P D (1994). Effects of sward height and concentrate supplementation on the ingestive behaviour of spring calving dairy cows grazing grass clover swards. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 40:101–112.
64. Robertson J B, Van Soest P J (1981). The detergent system of analysis. En: James, W.P.T., Theander, O. (Eds.), *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. Marcel New York, Dekker, p. 123-158.
65. Rovira J. (1996). Manejo nutritivo de los rodeos de cría en pastoreo. Buenos Aires. Hemisferio Sur. 321p.
66. Russell J B, Hespell R B (1981). Microbial rumen fermentation. *J. Dairy Sci.* 64: 1153-1169.
67. Russell J B, Wilson D B (1996). Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79: 1503-1509.
68. Rymer C, Huntington J A, Williams B A, Givens D I (2005). In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim Feed Sci Technol.* 123–124:9–30
69. Santana A. (2012). Inclusión de pastura templada en una dieta completamente mezclada en terneras: efectos sobre el consumo, el aprovechamiento digestivo y metabólico. Tesis. Facultad de Veterinaria, UdelaR. 36p.

70. Sauvant D, Grenet E, Michalet-Doreau B (1995). Dégradation chimique des aliments dans le réticulo-rumen: cinétique et importance. En: Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly C, Farce MH, Journet M. Nutrition des ruminants domestiques. Paris, INRA. p.383-406.
71. Schofield P, Pitt R E, Pell A N (1994). Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. J Anim Sci 72:2980-2991.
72. Staddon J E R (2003). Adaptive Behavior and Learning. 2nd. Disponible en: <http://dukespace.lib.duke.edu/dspace/handle/10161/2878>. Fecha de consulta: 26/10/2016.
73. Stern M D, Varga G A, Clark J H, Firkins J L, Huber J T, Palmquist D L (1994). Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 77: 2762-2786.
74. Tebot I, Cajarville C, Repetto J L, Cirio A (2012). Supplementation with nonfibrous carbohydrates reduced fiber digestibility and did not improve microbial protein synthesis in sheep fed fresh forage of two nutritive values. Animal, 6: 617- 623.
75. Theodorou M K, Williams B A, Dhanoa M S, McAllan A B, France J (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Tech. 48: 185-197.
76. Trei J, Hale W H, Theurer B (1970). Effect of grain processing on in vitro gas production. J Anim Sci 30:825-831
77. Tilley, J M A and Terry R A (1963). A Two-Stage Technique for the in Vitro Digestion of Forage Crops. Grass and Forage Science, 18, 104-111.
78. Van Soest P J (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca, Cornell University Press, 476p.
79. Vera y Vega A (1986). Alimentación y pastoreo del ganado ovino. Tesis N° 87. Universidad de Córdoba 494p.
80. Williams B A, Bosch M W, Boer H, Verstegen M W A, Tamminga S (2005). An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. Anim. Feed Sci. Tech. 123-124:445-462.
81. Yokoyama M T, Johnson K A (1993). Microbiología del rumen e intestino delgado. En: Church, D. C. (Ed) El rumiante, fisiología y nutrición. Zaragoza, Acribia, p.p. 137-157.
82. Zebeli Q, Mansmann D, Steingass H, Ametaj B N (2010). Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: a key to lower the

risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livest Sci* 127:1-10.

83. Zuccari A E, Fernández G D, Sollazzo L A (2007). Efecto de la restricción en el tiempo de pastoreo durante la lactancia en ovinos. *Actas Vº Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*. Mendoza, Argentina, p. 152-154.