

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**INCORPORACIÓN DE DIFERENTES NIVELES DE ALFALFA, A UNA DIETA DE  
CONFINAMIENTO EN OVINOS EN CRECIMIENTO: EFECTO SOBRE LA  
FERMENTESCIBILIDAD DEL LIQUIDO RUMINAL**

**Por**

**Bruno OUDRI FELIX**

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

**MODALIDAD: Ensayo Experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2013**

## PAGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

---

**Lic. Martín Fraga**

Segundo miembro (Tutor):

---

**Dra. Analía Pérez Ruchel**

Tercer miembro:

---

**Dr. Luis Cal**

Cuarto miembro (Co-Tutor)

---

**Dra. Cecilia Cajarville**

Fecha:

Autor:

---

**Br. Bruno Oudri Felix**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primera instancia quisiera agradecer a todo el equipo de los departamentos de Nutrición y Producción de Rumiantes por el apoyo tanto en los trabajos de campo como en el laboratorio.

A todos los compañeros integrantes del proyecto de la tesis de Doctorado de nuestra Tutora Analía Pérez.

A Analía por el respaldo dado en toda la elaboración de esta tesis y del mismo modo a Cecilia Cajarville como co-Tutora.

Agradecer también a la Dra. Elena De Torres, responsable del campo experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria y a todos los empleados que trabajan allí.

A mi familia y a Viviana....

## TABLA DE CONTENIDO

Página

1. PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
2. AGRADECIMIENTOS.....	3
3. TABLA DE CONTENIDO.....	4
4. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
5. RESUEN.....	6
6. SUMMARY.....	7
7. INTRODUCCIÓN.....	8
8. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
8.1. Generalidades de la fermentación ruminal.....	9
8.2. Estudio de la fermentescibilidad ruminal.....	10
8.3. Sistemas intensivos de producción ovina.....	12
8.3.1. Características generales de las pasturas templadas.....	12
8.3.2. Suplementación de pasturas con granos de cereales.....	14
8.3.3. Utilización de raciones totalmente mezcladas (RTM).....	14
8.4. Suplementación con una pastura templada a una ración totalmente Mezclada (RTM).....	14
9. HIPÓTESIS.....	17
10. OBJETIVO GENERAL.....	18
11. OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
12. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
12.1. Animales, dietas y tratamientos.....	19
12.2. Mediciones y cálculos.....	21
12.3. Análisis estadísticos.....	23
13. RESULTADOS.....	24
14. DISCUSIÓN.....	30
15. CONCLUSIONES.....	33
16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
<b>Cuadro I.</b> Ingredientes de la RTM.....	20
<b>Cuadro II.</b> Composición química de los ingredientes de la RTM, la RTM y la pastura utilizados en el experimento.....	20
<b>Cuadro III.</b> Composición de las soluciones utilizadas en el medio de incubación para la producción de gas <i>in vitro</i> (Williams et. al. 2005).....	22
<b>Cuadro IV.</b> Parámetros de los volúmenes de producción de gas por gMSi, al modelizar los datos por Orskov.....	28
<b>Cuadro V.</b> Parámetros de los volúmenes de producción de gas por gMOF, al modelizar los datos por Orskov.....	29
<b>Figura 1.</b> Volumen total de gas producido V (mL/g MSi) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia.....	11
<b>Figura 2.</b> Volumen de gas acumulado para los diferentes tratamientos.....	24
<b>Figura 3.</b> Volumen de gas acumulado hasta la hora 96 para los diferentes tratamientos al utilizar como sustrato ensilado planta entera de maíz.....	25
<b>Figura 4.</b> Volumen de gas acumulado hasta la hora 96 para los diferentes tratamientos al utilizar como sustrato alfalfa.....	26
<b>Figura 5.</b> Volumen de gas acumulado hasta la hora 96 para los diferentes tratamientos al utilizar como sustrato maíz.....	27

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de la incorporación de niveles crecientes de una pastura de alfalfa fresca en una ración totalmente mezclada (RTM) sobre las características del inóculo ruminal en ovinos. Veinticuatro corderos fistulizados y alojados en jaulas de metabolismo individuales, fueron asignados a 4 tratamientos: "RTM", RTM a voluntad durante todo el día; "RTM75", RTM a nivel de 75% del consumo potencial y alfalfa; "RTM 50", RTM a nivel de 50% del consumo potencial y alfalfa; y "Pasto", alfalfa a voluntad durante todo el día. La alfalfa (*Medicago sativa*) en estado vegetativo se cortó diariamente y se suministró fresca, a voluntad, luego de que los animales terminaran de consumir las correspondientes cantidades de RTM. A cada animal se le colectó inóculo ruminal a las 2 horas de iniciada la comida (administración de RTM). Se utilizaron como sustratos ensilado de planta entera de maíz, grano de maíz (componentes principales de la RTM) y alfalfa (suministrada en el ensayo), que fueron introducidos en frascos (0,5 g/frasco, 1 frasco/sustrato/animal (1x3x24) + 2 blancos/animal (2x24), total=120 frascos) e incubados a 39,5°C. La presión de gas fue medida a diferentes horarios durante 96 h. Los resultados fueron comparados mediante PROC. MIXED considerando sustrato (S), inóculo (I) y la interacción SxI. El mayor nivel de inclusión de pasto en la dieta generó mayor producción de gas. Los volúmenes de gas acumulados a la hora 96 por gMSI, fueron aumentando de forma lineal ( $p=0,030$ ), a medida que aumentó la inclusión de pastura. La menor producción de gas obtenida con el tratamiento RTM, con respecto al resto de los tratamientos, estaría relacionado a que el N podría haber actuado como limitante en la producción de gas. La inclusión de pastura en la dieta de los animales disminuyó linealmente la tasa de producción de gas (kd). El inóculo del tratamiento RTM75 fue el que generó menor tiempo de latencia en la producción del gas (Lag) y, a su vez, al utilizar pasto como único sustrato este inóculo fue el que generó más gas, lo que nos podría indicar un inóculo más activo o con mayor concentración de microorganismos.

## SUMMARY

We evaluated the effect of incorporating increasing levels of fresh alfalfa pasture on a totally mixed ration (RTM) on the characteristics of sheep rumen inoculum. Twenty-four fistulized lambs, housed in individual metabolism cages, were assigned to 4 treatments: "RTM"; RTM at will throughout the day, "RTM75" RTM 75% level of potential consumption and alfalfa; "RTM 50", RTM 50% level and alfalfa potential consumption and "grass", alfalfa at will throughout the day. Vegetative Alfalfa (*Medicago sativa*) cut fresh daily and delivered at will, after animals finished consuming the corresponding RTM amounts. Ruminal inoculum was collected from each animal 2 hours after the start of meal (administration RTM). Whole plant corn silage; grain corn (major components of the RTM) and alfalfa (supplied in the assay), introduced in vials (0.5 g / bottle, 1 bottle / substrate / animal (1x3x24) + 2 White / animal (2x24), total = 120 flasks) and incubated at 39.5 ° C were used as substrates. Gas pressure was measured at different times during 96 h. The results were compared using PROC. MIXED considering substrate (S), inoculum (I) and SxI interaction. The higher level of grass in the diet resulted in higher gas production. Cumulative gas volume 96 hours after when gMSI were increased linearly ( $p = 0.030$ ), as pasture inclusion increased. N action in reducing gas production could be the reason for a lower gas production with RTM treatment, regarding other treatments. Pasture inclusion into the the animals' diet decreased linearly the gas production rate (kd). Treatment with RTM75 inoculum was the one with shorter latency time in the production of gas (Lag) and, at the same time by using grass as sole substrate this inoculum was the one generating more gas, which can lead us to a more active inoculum with a higher concentration of microorganisms.

## INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción de rumiantes, los forrajes representan el principal alimento en las zonas templadas de todo el mundo (Elizalde, 2003). En Uruguay, las pasturas templadas son ampliamente utilizadas, ya sea como praderas mezcla de gramíneas y leguminosas o verdeos.

La calidad de las pasturas templadas es muy elevada, pero en ciertos momentos del año, es un recurso limitante debido a la cantidad que se dispone, por lo que el tiempo de acceso a la pastura generalmente es restringido.

La producción de rumiantes y toda la producción pecuaria, en general, han sufrido un importante proceso de intensificación. Es por esto que es imperativo buscar alternativas de manejo que acompañen dicha intensificación. A nivel mundial, en este tipo de sistemas es común la utilización de Raciones Totalmente Mezcladas (RTM). Este tipo de dieta permite alcanzar elevados niveles de producción. Con el propósito de obtener aún mejores respuestas en los animales, resulta interesante la combinación de un sistema de alimentación basada en la utilización de una RTM y el pastoreo, que podría beneficiar la digestión y fermentación ruminal.

Existe una amplia información en cuanto a la suplementación o no con concentrados a animales en pastoreo (Reis y Combs, 2000; Bargo et al. 2002a; Bargo et al., 2003; Sairanen et al., 2005; Tebot 2008; Aguerre 2010). Algunos trabajos evalúan la utilización de RTM y lo comparan con los sistemas pastoriles (Kolver y Muller, 1998; Bargo et al., 2002b; Santana et al., 2011) y otros trabajos evalúan específicamente la combinación de RTM y pasturas (Bargo et al., 2001; Bargo et al., 2002b; Mendoza et al., 2011; Santana et al., 2011). La mayoría de estos trabajos han sido realizados con bovinos. En ovinos, no existen a nuestro alcance trabajos que evalúen la actividad fermentativa del líquido ruminal en ovinos alimentados con RTM y pasturas.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Generalidades de la fermentación ruminal

El proceso de digestión de los rumiantes involucra una serie de interacciones entre la dieta, los microorganismos ruminales y el animal hospedador. La fermentación ruminal es el resultado de actividades físicas y microbiológicas que transforman los componentes de la dieta en productos utilizables para el rumiante (ácidos grasos volátiles (AGV), proteína microbiana y vitaminas del complejo B) así como productos de desecho (metano y dióxido de carbono) (Van Soest, 1994).

El retículo-rumen proporciona un sistema de cultivo continuo para bacterias, protozoos y hongos anaerobios. Los alimentos llegan junto con el agua al rumen y estos son parcialmente fermentados, dando lugar principalmente a AGV, células microbianas, y los gases metano y dióxido de carbono. Los gases se eliminan por la eructación, y los AGV se absorben, en su mayor parte, a través de la pared ruminal.

Para que el crecimiento microbiano ruminal y la fermentación de los carbohidratos sea óptima, el medio ruminal debe tener un pH entre 6,7 y 6,8, una concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) de al menos entre 5 y 8 mg/dL y una concentración de AGV de 75 a 90 mM, con una relación de acetato: propionato de 3,5 a 1 (Rearte, 1992; Van Soest, 1994).

Los principales nutrientes necesarios para la síntesis de proteína microbiana en rumen (crecimiento de los microorganismos), son una fuente nitrogenada y sustratos fermentables, que provean a los microorganismos de una fuente de energía (Aldrich, 1993).

El pH representa uno de los principales parámetros que afectan directamente al crecimiento microbiano y, en consecuencia, a la fermentación ruminal. Los alimentos que ingresan al rumen poseen una composición química y fermentabilidad diferente, con lo cual generan variaciones en el pH ruminal. El pH puede fluctuar incluso a lo largo del día, dependiendo del tipo de dieta, de la frecuencia de alimentación y del nivel de ingesta, entre otros (Cerrato et al., 2005).

Cuando se incluyeron concentrados en la dieta de animales consumiendo pasturas templadas algunos autores reportaron disminución en el pH (Elizalde et al., 1999; Bargo et al., 2002a; Sairanen et al., 2005; Cajarville et al., 2006; Tebot, 2008) y otros no encontraron cambios en este parámetro (vanVuren et al., 1993). En el experimento realizado por Bargo et al. (2002b) no se encontraron diferencias en el pH ruminal de vacas lecheras consumiendo dietas solo RTM o RTM y pastura. Según Coppock et al. (1981), la oferta de una fuente de fibra al mismo tiempo que los alimentos con elevada concentración energética, como ocurre en una RTM, minimizaría las variaciones en la tasa de producción de AGV y, por tanto, del pH ruminal.

El N-NH<sub>3</sub> surge como producto final de la degradación de las proteínas, a partir del catabolismo microbiano de aminoácidos, péptidos y sustancias nitrogenadas no

proteicas como la urea, que puede ser obtenida a partir de la dieta o endógena (Russell y Hespell, 1981). Éste puede ser utilizado por los microorganismos ruminales para la síntesis de proteína microbiana. De este modo el rumiante puede obtener tanto los aminoácidos esenciales como no esenciales, independiente del alimento consumido (Mc. Donald et al., 2006) y obtener así la principal fuente de aminoácidos para el propio animal (Strobel y Russell, 1986).

En cuanto a los niveles de N-NH<sub>3</sub> en rumen, al suplementar con concentrados a animales consumiendo pasturas templadas, hay varios trabajos realizados que reportan una disminución en los valores medios de este compuesto y esta disminución es mayor cuanto mayor es la inclusión del concentrado en la dieta (van Vuren et al., 1993; Elizalde et al., 1999; Reis y Combs, 2000; García et al., 2000; Bargo et al., 2002a; Sairanen et al., 2005). La explicación a esta caída en los niveles de N-NH<sub>3</sub> ruminal sería por una mayor captación para la síntesis microbiana.

## **Estudio de la fermentescibilidad ruminal**

El valor nutritivo de los alimentos para rumiantes se puede estimar a través de métodos *in vivo* e *in vitro*. La estimación *in vivo* está limitada por la necesidad de un número representativo de animales y de alimento suficiente como para mantenerlos (Fondevila y Barrios, 2001), entre otras cosas. Para superar estos inconvenientes se emplean técnicas *in vitro* que simulan los procesos digestivos (Tilley y Terry, 1963). Las técnicas *in vitro* son menos costosas, requieren menos tiempo para su realización y sus resultados están altamente correlacionados con los obtenidos mediante pruebas *in vivo*. Además, para que los métodos *in vitro* sean eficientes, es necesario que sean fácilmente reproducibles (Getachew et al., 1998).

Una de las técnicas *in vitro* más utilizadas para evaluar el valor nutritivo de los alimentos para rumiantes, es la medición del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo, a través de la incubación del alimento con líquido ruminal, en un medio anaerobio a 39,5 °C (Menke y Steingass, 1988). Mediante esta técnica se puede conocer el grado y la cinética y la tasa de degradación de los alimentos. La producción de gas (volumen y tasa) además de predecir la fermentescibilidad, se correlaciona positivamente con la digestibilidad de la materia orgánica y el consumo voluntario de los animales (Chenostet al. 2001). Williams (2000), indica también, que es posible la predicción del contenido de Energía Metabolizable, y la calidad del alimento.

En 1954, McBee describió un método manométrico para medir la producción de gas utilizando bacterias ruminales. Menke y Steingass (1988), describieron un sistema en el cual la producción de gas es usada para la predicción de la digestibilidad y el contenido de energía metabolizable. Este método utiliza una jeringa donde se incuba el sustrato en un medio con un buffer y líquido ruminal. La producción de gas es medida a intervalos regulares. Theodorou et al. (1994), propusieron y desarrollaron la técnica para la medición manual de la presión usando un transductor de presión, un ensamble de jeringa/transductor que registra el gas acumulado.

Las curvas de producción de gas pueden ser ajustadas a diferentes modelos matemáticos (Posada y Noguera, 2007). Uno de los modelos utilizados, es el modelo exponencial simple con latencia (lag) descrito por Ørskov y Mc Donald (1979) (Figura 1). En este modelo, durante la fase inicial ocurre la hidratación y colonización del sustrato insoluble por los microorganismos ruminales. Cuando el sustrato es saturado con microorganismos y enzimas, la fase exponencial toma lugar; durante esta fase la porción más degradable del sustrato insoluble es degradada primero, mientras que el sustrato menos digestible precisa de más tiempo para ser degradado. Finalmente, cuando la fracción potencialmente degradable ha sido fermentada, la producción de gas tiende a cero (Posada y Noguera, 2007). La descripción estadística por modelos matemáticos de las curvas de producción de gas permite la comparación de la degradación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación, y proporciona información sobre las tasas de fermentación de los constituyentes (Noguera y col., 2004).

Tiempo (h)

lag

V

$$V = a \times (1 - e^{-(k_d \times (t - \text{lag}))})$$

Volumen (ml/g MSi)

Figura 1. Volumen total de gas producido V (mL/g MSi) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia; a = volumen de gas a un tiempo t (mL/g MSi); Kd: tasa de producción de gas (%/h); t = tiempo de incubación (h); lag: tiempo de retardo en la producción de gas (h)

Rymer et al. (2005), llegaron a la conclusión de que el factor de mayor importancia en términos de su efecto sobre la técnica es el del inóculo y la actividad

microbiana que él posea. En el departamento de Nutrición y de Bovinos de la Facultad de Veterinaria, se ha utilizado la técnica de producción de gas fundamentalmente para evaluar los inóculos, tanto en bovinos (Antúnez y Caramelli, 2009; Pomiés, 2010; Bonifacino, 2012; Britos 2012), como en ovinos (Pérez-Ruchel, 2010), cuando se utilizaron animales consumiendo solo pasturas (Antúnez y Caramelli, 2009; Pérez-Ruchel, 2010), y al suplementarlos con concentrados almidonosos o no almidonosos (Pomiés, 2010; Britos 2012).

### **Sistemas intensivos de producción ovina**

Los sistemas de producción de rumiantes en Uruguay han sido intensificados en los últimos años. Esto es debido a varios factores que se asocian para llegar a esta condición. Entre estos cabe destacar que la producción de carne ovina en nuestro país ha aumentado 4 veces en el período 2002-2009 (DIEA, 2010), alcanzando una producción de carne de 85 mil toneladas en el período 2010-2011 (DIEA, 2012). Esto se enmarca en un aumento muy importante en la producción forestal y en la agricultura. Esta última pasó de 978.000 ha sembradas para cultivos de verano en el período 2004-2005 a 1.988.000 ha en el período 2011-2012, siendo los principales responsables de este aumento el trigo y la soja. En tanto que el área de forestación pasó de 1.486.000 ha en el 2004 a 1.722.000 ha en el 2007. Otro aspecto importante es el aumento sostenido que ha sufrido el valor de la tierra desde el 2002 a 385 U\$S/ha hasta llegar al 2011 a 3196 U\$S/ha (DIEA, 2012).

Todo esto ha llevado a que los sistemas pecuarios, para poder competir con los otros sistemas productivos, tienen que estar en un permanente proceso de intensificación, buscando un incremento en la producción individual y por hectárea, en donde toma un papel preponderante el manejo de la alimentación.

En el Uruguay es muy común emplear los granos de cereales y algunos subproductos agroindustriales como el afrechillo de trigo y el arroz como suplementos energéticos que pueden ser utilizados para aumentar la eficiencia de utilización del nitrógeno en praderas de pasturas templadas de alta calidad.

### *Características generales de las pasturas templadas*

En Uruguay la dieta base para la producción de rumiantes es forrajera. Las praderas artificiales representan el 7% del total del porcentaje de la superficie de pastoreo, lo que en números serían 992.247 ha. En tanto que las pasturas mejoradas representan el 16,3% del total (2.314.365 ha) (DIEA, 2012).

Las pasturas de clima templado suelen tener altos niveles de proteína bruta y altos niveles de carbohidratos no estructurales solubles (Elizalde y Santini, 1992). A mayor calidad de la pastura, menor contenido de fibra y mayor contenido de carbohidratos solubles (Rearte y Santini, 1989).

La calidad de las pasturas presenta variaciones que dependen de muchos factores, como la especie forrajera, época del año, estado de madurez e incluso variaciones que ocurren en el correr del día (Jarrige et al., 1995), como ocurre con el contenido de azúcares solubles (Repetto et al., 2003). En general, se considera como una

pastura de alta calidad aquella en que la digestibilidad supera el 70% (Kolver et al., 1998).

En los sistemas intensivos de nuestro país se utilizan gramíneas C3, leguminosas y sus mezclas. Las leguminosas más utilizadas son la alfalfa (*Medicago sativa*) y algunos tréboles (*Trifolium sp*) Las gramíneas, del grupo C3 son aquellas en el cual el primer producto de la fotosíntesis es un azúcar de 3 carbonos. Estas especies ocupan con frecuencia hábitats sombreados, fríos o muy húmedos con temperatura óptima de 15 a 30 °C y la eficiencia de su proceso fotosintético aumenta al disminuir la temperatura (Starr et al., 2004).

De acuerdo con un relevamiento realizado en nuestro país, que incluyó forrajes provenientes de 40 parcelas de establecimientos productivos, cortadas en diferentes estaciones del año y en distintos momentos del día, en general, las pasturas presentaron una composición química característica de un alto valor nutritivo, con 18% de MS, 19% PB, 40% de FND y entre un 6 y un 10% de azúcares solubles según la estación del año y el momento del día (Antúnez y Caramelli, 2009).

La degradabilidad de las fracciones fibrosas de este tipo de pasturas se ubica en torno al 50-60% (Aguerre, 2010; Tebot et al., 2012; Pérez-Ruchel et al., 2012). Por lo tanto, estas pasturas, les proveen a los microorganismos un forraje de alta digestibilidad, y además de alto contenido de proteína bruta de rápida degradación ruminal (Piaggio et al., 2003; Repetto et al., 2005), lo que se puede asociar a elevadas concentraciones de N-NH<sub>3</sub> en el rumen (Khalili y Sairanen, 2000; Cajarville et al., 2006).

La elevada fermentescibilidad de estas pasturas ha sido medida a través de la técnica de producción de gas *in vitro* (Antúnez y Caramelli, 2009; Britos et al., 2009). La alta fermentescibilidad lleva a que la concentración media de AGV en el rumen sea también alta. En experimentos realizados en Uruguay, con animales consumiendo exclusivamente praderas, la concentración media de AGV fue de 95 mM de líquido, con picos máximos de 130 mM luego de 4 horas del comienzo de la ingesta (Cajarville et al., 2006). Estas concentraciones son superiores a las comunicadas en la literatura para dietas forrajeras.

Si bien las pasturas templadas con las que cuenta el país son de muy buena calidad, la cantidad de que disponemos podría actuar como limitante durante diferentes períodos del año, sobre todo si pensamos en producciones elevadas y constantes a lo largo del año. En este sentido, es difícil prever la duración e intensidad de los otoños y los cambios a los que conducen en el forraje, que se traducen en una mayor o menor ganancia en los animales. En este sentido, Ganzábal et al. (2003), realizó un monitoreo acerca de las ganancias otoñales en ovinos en engorde con pasturas de alta calidad y muestran que el problema existe y afecta indistintamente a corderos de diferentes biotipos, diferente edad y sobre diferentes pasturas. Esto conlleva a una disminución en la curva de crecimiento, postergando el tiempo de engorde de los corderos y dificultando el cumplimiento de los objetivos del sistema de producción.

#### *Suplementación de pasturas con granos de cereales*

Es muy común a nivel mundial, la suplementación de pasturas con granos de cereales, con el fin de adicionar energía y permitir el uso de altas cargas animales.

Esta suplementación con concentrados energéticos, generalmente conduce a un aumento del consumo de MS total y a su vez trae aparejada la disminución del consumo de forraje, o sea la sustitución de forraje por concentrado (Reis y Combs, 2000; Bargo et al. 2002a; Bargo et al. 2003). Sin embargo, la inclusión de altos niveles de concentrados en la dieta pueden conducir a disminuciones del pH ruminal, lo cual puede disminuir la degradabilidad del forraje (Allen, 1997) e inducir a estados de acidosis ruminal, esta disminución del pH ruminal podría estar dado por una disminución de la producción de saliva o por una alta producción de AGV en el rumen (Bach y Calsamiglia, 2006).

### *Utilización de raciones totalmente mezcladas*

La utilización de RTM en sistemas intensivos resulta una herramienta muy utilizada a nivel mundial pero relativamente reciente en nuestro país.

Las RTM son raciones donde los forrajes y alimentos concentrados son completamente mezclados, y de esta forma se ofrecen a los animales. Algunas de las ventajas de la utilización de RTM son que, al formular la dieta cada insumo puede ser añadido en las cantidades que se precisen, facilitando la formulación. Además, se reducen al mínimo las posibilidades de selección de cada componente de la ración por los animales (Gill, 1979), y por tanto permite una adecuada relación de la ingestión de fibra y concentrados.

Cuando los animales son alimentados con RTM, el consumo de nutrientes, sobretodo energéticos, es mayor que el que se alcanza con animales a pastoreo. Al respecto, según Kolver (2003), cuando los animales son alimentados únicamente con pasturas no logran alcanzar su máximo potencial productivo, ya que el consumo de MS y, por lo tanto, la ingesta de nutrientes es menor que cuando los animales son alimentados con RTM. Ello se debe a restricciones de tipo físicas (digestión y pasaje de material por el tracto digestivo), por limitación de tiempo (actividades de búsqueda, cosecha y rumia del forraje ingerido), o por la alta cantidad de agua ingerida con la pastura (Chilibroste *et al.*, 2005; Dillon, 2006).

En contra partida algunas de las desventajas de la utilización de la RTM podrían ser una mayor incidencia de desórdenes como acidosis, laminitis y cetosis (Charlton et al., 2011).

### *Suplementación con una pastura templada a una ración totalmente mezclada*

A nivel mundial en los sistemas de alimentación, se han ido disminuyendo progresivamente la proporción de fibra en las raciones con el fin de maximizar los aportes energéticos al animal. Sin embargo los modelos actuales de alimentación recomiendan un mínimo de fibra para asegurar un correcto funcionamiento ruminal. La fibra aporta una textura física al contenido ruminal que estimula la rumia, la masticación y la secreción salivar y regula el ritmo de paso.

Si bien es escasa la información existente, la combinación de un sistema de alimentación basada en pastoreo y la utilización de una RTM puede mejorar el rendimiento a través de cambios en la digestión y fermentación ruminal. Este

sistema se ha denominado RTM parcial (RTMp), porque el pasto del pastoreo de las vacas no forma parte de la RTM (Bargo et al., 2001). Alimentar al ganado con RTM y pasturas ha resultado en un mayor rendimiento, debido al mayor consumo total de MS y la producción de leche, con un mayor contenido de grasa y proteína (Bargo et al., 2001). Los posibles efectos positivos sobre la fermentación ruminal podría incluir un pH ruminal superior o una mayor estabilidad y una reducción en la concentración ruminal de N-NH<sub>3</sub>, quizás debido a la inclusión en la dieta de fuentes de forrajes con elevado contenido de fibra efectiva, o menor contenido de proteína bruta (PB), o debido a una mayor captación de N para la síntesis de proteína microbiana. Sin embargo, con la combinación de pastura y RTM, pueden ocurrir efectos asociativos en el rumen, tales como una reducción de la digestión de la FDN del pasto (Dixon y Stockdale, 1999).

Bargo et al. (2002b) estudiaron la digestión y fermentación ruminal en vacas lecheras Holando de alta producción canuladas en rumen, distribuidas al azar en tres grupos (tratamientos) diferentes. En un grupo las vacas fueron alimentadas con pasturas y concentrados (39% de concentrado y 61% de pasto), en el otro tuvieron acceso a pastoreo y RTM (RTMp) en proporciones de 10% concentrado, 29% pasto, 61% RTM) y en el tercero solo fueron alimentadas con RTM (100% RTM). Las vacas alimentadas con pasto y RTM, consumieron mayor cantidad de MS ( $25,7 \pm 1,4$  kg/d), que las que consumieron pasto más concentrado ( $22,6 \pm 1,4$  kg/d) y a su vez las tratadas solo con RTM, consumieron más que aquellas sometidas a los tratamientos anteriores ( $26,3 \pm 1,4$  kg/d). En lo que tiene que ver con el pH ruminal estos autores no detectaron cambios entre los diferentes tratamientos (promedio:  $5,87 \pm 0,04$ ). Lo mismo sucedió cuando se midió la concentración de AGV, que no difirió entre los distintos tratamientos (promedio: 137,5 mmol/L). La concentración de N-NH<sub>3</sub> fue significativamente mayor para el tratamiento de pasto con concentrado que el tratamiento de pasto más RTM (RTMp) y solo RTM.

El grupo de investigación de Nutrición y Bovinos de Facultad de Veterinaria (UdelaR) recientemente comenzó a estudiar la combinación de RTM y pasturas (RTMp) tanto con bovinos de carne como de leche. Santana et al. (2011), combinaron una pastura con una RTM en vaquillonas de carne con tres tratamientos diferentes: 1) Solo RTM a voluntad, 2) solo forraje a voluntad y 3) forraje a voluntad durante 6 h y luego RTM a voluntad el resto de las horas del día, y encontraron un aumento en el consumo de MS de los animales alimentados con forraje y RTM hasta niveles de más de 3,5 del PV, 24% superiores al nivel de consumo de los animales alimentados únicamente con RTM, y 44% superiores a los niveles de consumo alcanzados por los animales alimentados con forraje como único alimento. Además, el incremento en los niveles de consumo de los animales alimentados con una mezcla de RTM y forraje.

Mendoza et al. (2011); trabajando con vacas de leche en producción las cuales fueron sometidas a tres tratamientos: 1) solo RTM a voluntad, 2) forraje a voluntad por 4 h y luego RTM a voluntad y 3) forraje a voluntad durante 8 h y luego RTM a voluntad. En este trabajo se encontró que no hubo diferencias en el consumo de MS, en la producción ni en la composición de leche, al comparar los tratamientos RMT4 y RTM0. Mientras que si lo hubo al comparar el tratamiento RTM0 con el RTM8, donde con este último disminuyó el consumo de MS, el rendimiento de la leche, el porcentaje de proteínas, el rendimiento total de caseína y tendió a disminuir la grasa de la leche y el rendimiento de la lactosa.

Si bien existen algunos trabajos de animales alimentados con pasturas y RTM, tanto a nivel mundial como a nivel nacional, son escasos los trabajos que evalúen la combinación de pasturas y RTM en ovinos, y específicamente no existen, al menos a nuestro alcance, trabajos que estudien la actividad fermentativa ruminal en ovinos.

### **HIPÓTESIS**

La incorporación de un bajo nivel de una pastura templada a una RTM, incrementará la actividad fermentativa ruminal en ovinos.

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de la inclusión de diferentes niveles de pastura a animales alimentados con una RTM, sobre la actividad fermentativa ruminal en ovinos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Evaluar el efecto de la inclusión de diferentes niveles de un forraje fresco a una RTM sobre la magnitud de la fermentación ruminal, mediante la técnica de producción de gas *in vitro*.

Evaluar el efecto de la inclusión de diferentes niveles de un forraje fresco a una RTM en la cinética de la fermentación ruminal, mediante la técnica de producción de gas *in vitro*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento se realizó en el Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria (UDELAR), y en el campo experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria.

## Animales, tratamientos y dietas

Se utilizaron 24 corderos Corriedale x Milchschaf, con un peso vivo promedio de  $25,2 \pm 3,67$  kg, fistulizados en rumen. Los animales permanecieron durante todo el experimento, en jaulas metabólicas individuales. Los animales fueron bloqueados según su PV y asignados al azar a uno de los siguientes 4 tratamientos:

RTM	Ración totalmente mezclada (RTM) a voluntad durante todo el día
RTM75	RTM a un nivel equivalente al 75% del consumo potencial de los animal y luego pastura a voluntad
RTM50	RTM a un nivel equivalente al 50% del consumo potencial de los animal y luego pastura a voluntad
PASTO	Pastura a voluntad durante todo el día

Para la formulación de la RTM se calcularon los requerimientos diarios de los animales con el fin de obtener ganancias diarias de 250 a 300 gramos por día, teniendo en cuenta el PV de los animales y utilizando las tablas de NRC para ovinos (NRC, 2007).

La RTM estuvo compuesta por ensilado de planta entera de maíz, maíz, y harina de soja como componentes principales (Cuadro I), su composición se puede observar en el Cuadro II. La RTM se suministró en cantidades fijas según el tratamiento, y cuando los animales terminaban esa cantidad fija de RTM (según el PV) se les suministró el forraje a voluntad durante el resto del día.

Como forraje se utilizó una pastura compuesta principalmente por: alfalfa (*Medicago sativa*) en un 79,2%, el resto de los componentes fueron: lotus (*Lotus corniculatus*) 1%, raigrás (*Lolium multiflorum*) 15,6%, malezas y restos muertos 4,2%, en base seca. Esta fue cortada en estado vegetativo, diariamente a una altura de 5 cm del suelo y suministrada fresca (disponibilidad inicial: 1475 kg MS/ha).

Cuadro I. Ingredientes de la RTM

Ingredientes	% en Base Seca
--------------	----------------

<b>Harina de soja peleteada</b>	35,0
<b>Grano de maíz seco partido</b>	32,1
<b>Ensilado planta entera de maíz</b>	30,0
<b>Bicarbonato de sodio</b>	1,2
<b>Carbonato de calcio</b>	1,0
<b>Cloruro de amonio</b>	0,5
<b>Sales y vitaminas</b>	0,2

Cuadro II. Composición química de los ingredientes de la RTM, la RTM y la pastura utilizados en el experimento

<b>%</b>	<b>Ensilado</b>	<b>Maíz</b>	<b>H. Soja</b>	<b>RTM</b>	<b>Alfalfa</b>
<b>MS</b>	15,6	89,0	90,9	39,9	29,6
<b>MO *</b>	91,5	98,4	94,0	94,0	90,5
<b>PB *</b>	8,11	13,6	46,0	19,8	20,9
<b>FND *</b>	64,0	12,0	21,1	36,8	34,6
<b>FAD*</b>	34,4	3,20	7,59	17,2	21,1
<b>EE*</b>	2,16	2,91	1,31	2,53	1,65

\*% base seca. MS= materia seca; MO= materia orgánica; PB= proteína bruta; FND= fibra neutro detergente; FAD= fibra ácido detergente; EE= extracto etéreo.

El trabajo consistió en 21 días de adaptación de los animales a las condiciones experimentales y a las dietas, y 4 días de mediciones. Durante la adaptación a cada animal se le implantó quirúrgicamente un catéter permanente para el muestreo de líquido ruminal.

### **Mediciones y cálculos**

Se evaluó la actividad fermentativa ruminal de los animales sometidos a los distintos tratamientos mediante la técnica de producción de gas *in vitro*. Se utilizaron

como inóculos el líquido ruminal de cada animal y tratamiento que fue extraído a la hora 2 en relación al inicio de la comida principal (administración de RTM según correspondía, (h0= 8:00h). Como sustratos se utilizaron dos de los componentes principales de la RTM (ensilado de planta entera de maíz y maíz) y la alfalfa utilizada en el ensayo.

La técnica empleada para la determinación de la producción de gas fue la descrita por Mauricio et al. (1999). La noche anterior al día de la inoculación, día 21 de adaptación, se procedió a acondicionar los frascos (125 mL de capacidad), agregando a cada sustrato (0,5 g MS molido) 38 mL de una solución basal libre de N, 2 mL de una solución de carbonato de sodio (buffer) y 0,5 mL de una solución reductora (sulfuro de sodio), de acuerdo a Williams et al. (2005) (ver Cuadro III). Además, se utilizaron 2 blancos (frascos con todas las soluciones e inóculo pero sin sustrato) por inóculo proveniente de cada animal (3 sustratos + 2 blancos, por animal. Total: 120 frascos). Luego de agregar el sustrato y/o soluciones, los frascos fueron gaseados con CO<sub>2</sub>, se les colocó un tapón de goma y se llevaron a la heladera donde permanecieron hasta la mañana siguiente, con el fin de permitir que las partículas de sustrato se embebieran en la solución. Al día siguiente (día 22) se sacaron los frascos de la heladera y se colocaron en baño maría a 39,0°C por dos horas. Se inoculó cada frasco con 10 mL de líquido ruminal, y fueron saturados con CO<sub>2</sub>, tapados con tapón de goma y finalmente cerrados herméticamente con precinto de aluminio. Los frascos fueron colocados en el baño María donde permanecieron durante todo el período de incubación (39,5°C durante 96 h). La presión de gas, expresada en psi (libras por pulgada al cuadrado), se registró luego de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 horas de incubación, utilizando un manómetro digital (840065 Super Scientific, Scottsdale, Arizona, USA).

**Cuadro III. Composición de las soluciones utilizadas en el medio de incubación para la producción de gas *in vitro* (Williams et. al. 2005)**

<b>Solución basal libre de N (g/L)</b>	
KCl	0,60
NaCl	0,60
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,46
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,55
<b>Solución Buffer (g/L)</b>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	82,0
<b>Solución reductora (g/L)</b>	
Na <sub>2</sub> S <sub>9</sub> H <sub>2</sub> O	20,5
<b>Solución hemina (g/L)</b>	
Hemina	0,10
<b>Solución minerales traza (g/L)</b>	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,03
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
ZnCl <sub>2</sub>	0,03
CuCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,03
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05
SeO <sub>2</sub>	5,00
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
NaVO <sub>3</sub>	0,03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,25

Los datos de presión de gas (psi) registrados fueron transformados a volumen (V) mediante una ecuación de predicción obtenida en un experimento realizado previamente en condiciones similares a éste:  $V \text{ (mL)} = 4.40 P \text{ (psi)} + 0.09 P^2 \text{ (psi)}$ ,

**donde V=** Volumen (mL) observado; **P=** Presión en el interior de los frascos de fermentación (psi).

Al gas generado por cada frasco en cada medición se le restó el producido por los blancos. Los datos de volúmenes de gas producido a cada intervalo fueron acumulados hasta la hora 96 y se expresaron como mL de gas producido por g de MS incubada (MSi) y por g de MO fermentada (MOF). Para obtener la MOF, se procedió a pesar el contenido del residuo remanente en los frascos de incubación, y se llevó a estufa por 24hs a 105°C, para luego pesar nuevamente y así obtener el % de MS del material remanente luego de la incubación. Luego se llevó a un horno mufla por 3, h a 520°C y se pesaron nuevamente para obtener la cantidad de cenizas del material no desaparecido en los frascos, con lo cual 100 menos ese residuo mineral representará la materia orgánica (MO) del residuo no fermentado en el frasco. Para determinar la MO desaparecida en el frasco (MOF) se restó el contenido de MO residual a la cantidad de MO incubada inicialmente en el frasco.

Finalmente los volúmenes acumulados de gas se ajustaron al modelo exponencial simple propuesto por Ørskov y Mc Donald (1979),  $V = a \times (1 - e^{(-kd \times (t - lag))})$ , donde **V=** volumen de gas producido a tiempo t ( mL/g MSi), **a=** volumen total de gas producido (mL/g MSi), **Kd=** tasa fraccional de producción de gas (%/h), **lag=** tiempo de retardo en la producción de gas (h), **t=** tiempo de incubación (h)

## **Análisis estadísticos**

Los datos se compararon entre tratamientos (inóculos), utilizando el Proc. Mixed del SAS® (2002). Los volúmenes de gas acumulado, fueron comparados entre inóculos como medidas repetidas sobre el frasco usando el modelo:  $Y_{ijkl} = \mu + I_i + S_j + H_k + I \times H_{ki} + (I \times S)_{ij} + e_{ijkl}$ , donde  $\mu$  es la media general,  $I_i$  es el efecto fijo del inóculo ( $i=$  RTM, RTM75, RTM50, Pasto), en  $i$  réplicas de frascos ( $n= 6$  frascos)  $S_j$  es el efecto fijo del sustrato ( $j=$  ensilado de maíz, maíz y alfalfa),  $H_k$  el efecto fijo del tiempo ( $K= 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72$  o 96 horas),  $I \times H_{ki}$  la interacción entre inóculo y el tiempo  $I \times S_{ij}$  es el efecto fijo de la interacción entre inóculo y sustrato y  $e_{ijkl}$  es el error residual. valores de los parámetros obtenidos tras la modelización fueron comparados entre inóculos de acuerdo al siguiente modelo:  $Y_{ijk} = \mu + I_i + S_j + (I \times S)_{ij} + e_{ijk}$ , donde  $\mu$  es la media general,  $I_i$  es el efecto fijo del inóculo ( $i=$  RTM, RTM75, RTM50, Pasto), en  $k$  réplicas de frascos ( $n= 6$  frascos)  $S_j$  es el efecto fijo del sustrato ( $j=$  ensilado de maíz, maíz y alfalfa), y  $I \times S_{ij}$  es el efecto fijo de la interacción entre inóculo y sustrato y  $e_{ijk}$  es el error residual. Para cada variable se evaluó el efecto lineal. Las medias de todos los parámetros evaluados fueron comparadas mediante el test de Tukey. Se consideraron como diferencias significativas cuando  $P \leq 0,05$  y  $0,05 < P < 0,10$  fueron considerados como tendencias.

## **RESULTADOS**

Los volúmenes de gas acumulados a la hora 96 sin modelizar, se presentan en conjunto para todos los sustratos ya que la interacción entre inóculo y sustrato fue no significativa, y los valores promedios fueron de 172 mL/gMSi para el tratamiento solo RTM; 206 mL/gMSi para el tratamiento RTM75; 215 mL/gMSi para el tratamiento RTM50 y 229 mL/gMSi para el tratamiento Pasto (P de efecto del inóculo (I) < 0,001; P de efecto del Sustrato (S) <0,001 y P de IxS= 0,408).

En la Figura 2, se presentan las medias y el error estandar del volumen de gas acumulado para cada hora de medición y para los diferentes tratamientos, utilizando todos los sustratos. En general, a medida que aumentó el nivel de inclusión de pasto aumentó el volumen de gas producido y aumentó en forma lineal (P=0,041).

Figura 2. Volumen de gas acumulado hasta la hora 96 para los diferentes inóculos (tratamientos, Pasto: Pastura a voluntad durante todo el día; RTM: Ración totalmente mezclada a voluntad durante todo el día; RTM50: RTM a nivel de 50% del consumo potencial y luego pastura a voluntad; RTM75: RTM a nivel de 75% del consumo potencial y luego pastura a voluntad) ( $n=18$ ).

En la Figura 3, se presentan las medias y el error estandar de los volúmenes de gas acumulado para cada hora de medición, utilizando como sustrato ensilado planta entera de maíz. Se puede observar que la mayor producción de gas se obtiene al utilizar el inóculo del tratamiento Pasto, y la menor producción de gas producida con este sustrato se obtiene con el inóculo de los animales alimentados solo con RTM.

Figura 3. Volumen de gas acumulado hasta la hora 96 para los diferentes inóculos (tratamientos, Pasto: Pastura a voluntad durante todo el día; RTM: Ración totalmente mezclada a voluntad durante todo el día; RTM50: RTM a nivel de 50% del consumo potencial y luego pastura a voluntad; RTM75: RTM a nivel de 75% del consumo potencial y luego pastura a voluntad), utilizando como sustrato al ensilado de planta entera de maíz ( $n=6$ ).

En la figura 4 se presentan las medias y el error estandar de los volúmenes de gas acumulado y para cada hora de medición al utilizar como sustrato alfalfa. Los inóculos que generaron mayor producción de gas fueron los provenientes de los animales en los cuales en el tratamiento había alguna tipo de inclusión de pastura y, al igual que al utilizar el sustrato ensilado de planta entera de maíz, la menor producción de gas fue obtenida cuando se utilizó el inóculo de los animales alimentados solo con RTM.

Figura 4. Volumen de gas acumulado hasta la hora 96 para los diferentes inóculos (tratamientos, Pasto: Pastura a voluntad durante todo el día; RTM: Ración totalmente mezclada a voluntad durante todo el día; RTM50: RTM a nivel de 50% del consumo potencial y luego pastura a voluntad; RTM75: RTM a nivel de 75% del consumo potencial y luego pastura a voluntad), al utilizar como sustrato alfalfa ( $n=6$ ).

En la figura 5 se presentan las medias y el error estandar de los volúmenes de gas acumulado y para cada hora de medición al utilizar como sustrato grano de maíz. Hubo dos inóculos que se destacaron por una mayor producción de gas, el del tratamiento Pasto y el del tratamiento RTM50.

Figura 5. Volumen de gas acumulado hasta la hora 96 para los diferentes inóculos (tratamientos, Pasto: Pastura a voluntad durante todo el día; RTM: Ración totalmente mezclada a voluntad durante todo el día; RTM50: RTM a nivel de 50% del consumo potencial y luego pastura a voluntad; RTM75: RTM a nivel de 75% del consumo potencial y luego pastura a voluntad), al utilizar como sustrato maíz ( $n=6$ ).

En el Cuadro IV, se presentan las medias de los parámetros de producción de gas, obtenidos a partir de la modelización de los volúmenes de gas acumulados por gMSi, mediante el modelo de Orskov. Con el inóculo de los animales alimentados solo con pastura (Pasto), el parámetro volumen de gas (a) fue el mayor, comparado con el tratamiento RTM y RTM75. Al aumentar el nivel de inclusión de pasto en la RTM, hubo un aumento lineal ( $P=0,030$ ) en la producción de gas (a). O sea que, a medida que aumentó la inclusión de pasto en la dieta, aumentó la producción de gas, hasta llegar al máximo en el tratamiento Pasto. Por el contrario, la tasa de producción de gas (Kd) fue disminuyendo linealmente ( $P=0,041$ ) a medida que aumentó la inclusión de pastura. En lo que tiene que ver con el tiempo de retardo en la producción de gas (lag) el inóculo de los animales alimentados con menor inclusión de pastura en la RTM (RTM75), fue el más rápido en comenzar a producir gas, mientras que en el resto de los inóculos el tiempo lag fue similar.

Cuadro IV. Parámetros de producción de gas *in vitro* (gMSi), utilizando liquido ruminal extraído de los animales sometidos a los diferentes tratamientos (RTM: 100% RTM; RTM75: RTM a un nivel del 75% del consumo potencial y luego pastura a voluntad; RTM50: RTM a un nivel del 50% del consumo potencial y luego pastura a voluntad. Pasto: 100% Pastura) como inóculo.

	RTM	RTM75	RTM50	Pasto	ESM	P(I)	P(S)	P(IxS)
<b>a</b>	164 <sup>c</sup>	200 <sup>b</sup>	207 <sup>ab</sup>	231 <sup>a</sup>	9,623	<0,001	<0,001	0,234
<b>Kd</b>	0,12 <sup>a</sup>	0,105 <sup>ab</sup>	0,095 <sup>b</sup>	0,072 <sup>c</sup>	0,008	<0,001	<0,001	0,598
<b>L</b>	1,34 <sup>a</sup>	0,71 <sup>b</sup>	1,44 <sup>a</sup>	1,4454 <sup>a</sup>	0,169	0,006	<0,001	0,565

a = Volumen de gas producido (mL/gMSi); Kd= tasa fraccional de producción de gas ( $h^{-1}$ ); L= tiempo de retardo en la producción de gas (h); P (I): efecto del inóculo, P(S): efecto del sustrato utilizado, P (IxS): efecto de la interacción entre inóculo y sustrato; ESM: error estándar de las medias ( $n=6$ ). Para cada fila, letras diferentes entre medias son significativamente diferentes.

En el Cuadro V, se presentan las medias de los parámetros de producción de gas obtenidos a partir de los volúmenes de gas acumulados por gMOF mediante el modelo de Orskov. Se puede observar que el inóculo de los animales alimentados solo con RTM generó menor volumen de gas, similar al inóculo RTM75. La tasa de producción de gas fue similar entre inóculos. A su vez al comparar el tiempo de retardo en la producción de gas (lag), el tratamiento con menor inclusión de pastura a la RTM (RTM75), fue el que presentó menor L, en el resto de los tratamientos fue similar.

Cuadro V. Producción de gas *in vitro* (gMOF), utilizando líquido ruminal extraído de los animales sometidos a los diferentes tratamientos (RTM: 100% RTM; RTM75: RTM a un nivel del 75% del consumo potencial y luego pastura a voluntad; RTM50: RTM a un nivel del 50% del consumo potencial y luego pastura a voluntad. Pasto: 100% Pastura) como inóculo.

	RTM	RTM75	RTM50	Pasto	ESM	P(I)	P(S)	P(IxS)
<b>a</b>	456 <sup>b</sup>	550 <sup>ab</sup>	578 <sup>a</sup>	572 <sup>a</sup>	38,1371	0,16	<0,001	0,408
<b>Kd</b>	0,122	0,102	0,098	0,094	0,0555	0,60	<0,001	0,965
<b>L</b>	1,447 <sup>a</sup>	0,664 <sup>b</sup>	1,356 <sup>a</sup>	1,307 <sup>a</sup>	0,175	0,01	<0,001	0,398

a = Volumen de gas producido (mL/gMOF); Kd= tasa fraccional de producción de gas ( $h^{-1}$ ); L= tiempo de retardo en la producción de gas (h); P (I): efecto del inóculo, P(S): efecto del sustrato utilizado, P (IxS): efecto de la interacción entre inóculo y sustrato; ESM: error estándar de las medias ( $n=6$ ). Para cada fila, letras diferentes entre medias son significativamente diferentes.

## DISCUSIÓN

Mediante la técnica de producción de gas *in vitro* es posible cuantificar uno de los productos finales de la fermentación ruminal, el gas, compuesto principalmente por dióxido de carbono, hidrógeno, metano y ácidos grasos volátiles.

En este experimento la producción de gas obtenida considerando tanto los datos modelizados como los sin modelizar y para todos los sustratos en general, fue menor cuando se utilizó como inóculo, el líquido ruminal de los animales alimentados solo con RTM, comparado con el resto de los tratamientos, incrementándose a medida que aumentó la inclusión de pastura en la dieta. Este resultado se contrapone con los resultados obtenidos por Sandoval-Castro et al. (2002), quienes evaluaron la inclusión de diferentes mezclas de concentrado sobre forrajes de baja calidad y con los resultados de Britos et al. (2009), quienes utilizaron como inóculo, líquido ruminal proveniente de vaquillonas alimentadas con forraje y diferentes fuentes de carbohidratos. En ambos estudios se reportó un aumento en la producción de gas cuando se mezcló el forraje con el concentrado. La mayor producción de gas obtenida al aumentar la inclusión de pastura en las dietas de los animales donantes del inóculo, es un resultado muy llamativo y más aún que el tratamiento PASTO (solo pasto), fue el que generó mayor volumen de gas, esto nos podría indicar que estas dietas generaron un inóculo más activo.

Al modelizar los datos de los volúmenes de gas acumulados por gMSi, mediante el modelo de Orskov, obtuvimos que la producción de gas (a), al igual que los datos sin modelizar, fue aumentando de forma lineal a medida que aumentó la inclusión de pastura en la dieta. Este resultado no era esperado ya que, por lo general, cuanto mayor es el nivel de concentrados (almidón) en la dieta mayor es la producción de gas como se ha constatado en varias experiencias. Por ejemplo, Cone et al. (1996), encontraron que la producción de gas acumulada en 24h fue significativamente mayor al utilizar como sustrato una mezcla de mazorca de maíz en comparación con la hierba de centeno (*Lolium perenne*) mezclada con mazorca de maíz, utilizando líquido ruminal de ovejas que se alimentaban con una ración compuesta por una mezcla de heno y concentrado. En el mismo sentido, Bargo et al. (2002a), encontraron incrementos en los niveles de AGV en rumen cuando se suplementó con concentrados a animales consumiendo forraje en una baja proporción, en cambio al aumentar la disponibilidad de forraje por animal los niveles de AGV no se modificaron. Si bien en nuestro experimento no se midieron la concentración de AGV este podría ser una medida indirecta del volumen total. En otro estudio, Hess et al. (1996) utilizaron novillos de raza carnífera los cuales se encontraban pastoreando festuca (*Festuca arundinacea*) y se evaluaron 4 tratamientos, uno consistía en la administración solo de pastura y a los otros tres tratamientos se le fue añadiendo diferente proporción de concentrados (maíz o afrechillo de trigo). Estos autores encontraron que, para ambos concentrados, las proporciones de AGV totales fueron aumentando a medida que aumentaba la inclusión de concentrados. Si consideramos que, en este experimento, la solución basal utilizada para la fermentación *in vitro* era libre de N, y que se obtuvieron similares resultados de

volumen de gas acumulado para los diferentes sustratos utilizados, podríamos pensar que el N proveniente del inóculo podría haber actuado como limitante en la producción de gas para el tratamiento RTM. En forma similar a nuestros resultados, Vivart et al. (2010), utilizando una vaca Holando consumiendo una pastura compuesta predominantemente por alfalfa (*Medicago sativa*) y pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) como donante del inóculo, y utilizando 4 sustratos diferentes: 1) 100 % RTM, 2) 85 % RTM y 15 % pasto, 3) 70% RTM y 30 % pasto, 4) 55% RTM y 45% pasto, en frascos de fermentación; encontraron que fue mayor la producción de gas total al aumentar la inclusión de pasto en el tratamiento y, a su vez, una mayor concentración de AGV totales.

La tasa o velocidad de producción de gas (Kd) obtenida en este experimento fue mayor cuanto menor era el nivel de pastura. Este resultado se opone a los resultados descritos por Bargo et al. (2003) en una revisión bibliográfica sobre los efectos de la suplementación en vacas lecheras consumiendo pastura. Estos autores afirman que la suplementación no afectó la digestión de pastura *in situ*, excepto por la reducción en la tasa de degradación cuando los animales fueron suplementados con altas cantidades de concentrado. En el mismo sentido, Arroquy et al. (2005), quienes evaluaron *in vitro* los efectos de la inclusión de carbohidratos sobre la digestión de fibra de baja calidad, afirman que la tasa de digestión fue deprimida cuando una fuente de carbohidratos como el almidón fue incluida. Asimismo, Grant y Mertens (1992) reportaron que la adición de maíz a una dieta de heno de alfalfa (forraje de alta calidad) disminuyó el kd. Las diferencias existentes entre estos trabajos y el presente experimento podrían estar explicadas por el hecho de que en estos trabajos se utilizaron niveles de inclusión de concentrados muy altos los cuales podrían haber generado una disminución de pH, con lo cual la fermentación de la fibra podría verse afectada. Una de las explicaciones que podríamos dar a este resultado podría ser que al aumentar la proporción de pastura aumentaría la proporción de fibra a ser degradada en el rumen, por lo cual habría una mayor proporción de celulosa la cual es de más difícil y lenta degradación, comparado con los animales alimentados con mayor proporción de RTM, en donde habría una mayor cantidad de almidón que celulosa para ser degradado en rumen la cual es de más fácil y rápida degradación. Tomando juntos los datos de menor producción de gas y mayor Kd obtenidos con el tratamiento RTM, se podría pensar que el parámetro que más afectó la actividad microbiana ruminal para este tratamiento fue la limitante de la disponibilidad de N.

Por otro lado, con respecto al tiempo de retardo en la producción de gas (Lag) Britos (2012), encontró que cuando se incubaron concentrados con líquido ruminal de los animales suplementados con cebada se observó menor tiempo de latencia. Mientras que el fluido ruminal del grupo no suplementado sobre los concentrados produjo mayor tiempo de latencia y en genera el tiempo de latencia de la producción de gas fue más largo con el incremento de la inclusión de los cereales. En este experimento, el inóculo proveniente de los animales sometidos al tratamiento RTM75, fue el que presentó menor Lag comparado con los otros inóculos. Por lo tanto, una baja inclusión de forrajes en una RTM generó menor tiempo de latencia en la producción de gas. Este resultado podría indicar que un bajo nivel de pastura favoreció a la actividad microbiana ruminal, quizás por una mayor adhesión a las partículas, o por lograr mejores condiciones ruminales, o aportar algún micronutriente necesario para los microorganismos.

Además, en este experimento, cuando se utilizaron los datos de cada sustrato en forma individual, se observaron diferencias en la producción de gas. Cuando se utilizó como sustratos el silo planta entera de maíz en forma individual, el inóculo que generó mayor volumen de gas fue el del tratamiento Pasto, esto se pudo haber debido a que los m.o. ruminales estarían adaptados a la fermentación de la fibra al ser sustratos muy similares en el contenido fibroso de ambos forrajes. Cuando se utilizó maíz como sustrato, los dos tratamientos que generaron mayor producción de gas fueron los que contenían una mayor proporción de pastura, el tratamiento Pasto y el RTM50, este les proveería un sustrato energético a estos dos inóculos, sincronizando el aporte del sustrato energético y el de N. Además, resulta muy llamativo que cuando se utilizó como sustrato el mismo alimento que el que recibían los donantes de inóculo (alfalfa como sustrato y tratamiento Pasto), este sustrato presentó una menor fermentación, en este caso podría haber actuado como limitante la falta de una fuente de energía aportada por los concentrados. Por otro lado, cuando el sustrato utilizado fue alfalfa el inóculo que produjo más gas fue el que tuvo una menor inclusión de pastura (RTM75). Si vinculamos este resultado con el hecho de que el inóculo del tratamiento RTM75 generó menor tiempo de latencia en la producción de gas, podríamos decir que el inóculo de los animales con el nivel más bajo de inclusión de pastura en la RTM, habría resultado más activo o con mayor concentración de microorganismos.

Cuando se presentan los datos de volumen de gas por gMOf, se observa que los parámetros se comportan en el mismo sentido que cuando se analizaban para los datos expresados como MSi. Es decir mayor producción de gas (a), al aumentar la inclusión de pastura, la tasa de producción de gas (Kd), fue menor cuanto más pasto en la dieta y el menor Lag se obtuvo con el tratamiento RTM75. Esto nos indicaría que el perfil de fermentación para cada tratamiento fue diferente. Cuando se forman los ácidos ácido acético y butírico, el gas es producido tanto de forma directa (a partir de la descarboxilación oxidativa del piruvato a  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ ) como de forma indirecta (a partir de la reacción entre el tampón y los AGV para el mantenimiento del pH del medio). En cambio, cuando se forma ácido propiónico, el gas se produce sólo de forma indirecta, por lo que produce un menor volumen de gas (Fondevila & Barrios, 2001). Por lo tanto, en este trabajo, el menor volumen de gas generado a partir del inóculo de los animales alimentados con mayor proporción de RTM podría estar indicando una fermentación más propiónica

## CONCLUSIONES

A medida que aumentó la inclusión de pasto a la RTM fue aumentando el volumen de producción de gas y disminuyendo la tasa o velocidad de producción de gas.

El inóculo de los animales alimentados con RTM fue el que generó menor producción de gas y a su vez obtuvo mayor Kd, estos datos podrían indicar que la disponibilidad de N-NH<sub>3</sub> pudo haber actuado como limitante para este tratamiento.

El inóculo de los animales alimentados con el menor nivel de inclusión de pastura (RTM75) generó mayor producción de gas cuando se utilizó alfalfa como sustrato y generó menor tiempo de latencia en la producción de gas. Por lo tanto, el inóculo de estos animales habría resultado más activo o presentaría mayor concentración de microorganismos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1) 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. 43p.

2) 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, Facultad de Veterinaria, UdelaR. p 1-38.

3) Aldrich J.M, Muller L.D, Varga G.A. (1993). Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen flow and performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 76: 1091-1105.

4) Allen M.S., (1997). Relationship Between Fermentation Acid Productions in the Rumen and the Requirement for Physically Effective Fiber. J Dairy Sci; 80:1447–1462.

5) Arroquy, J.I., Cochran R.C., Nagaraja, T.G., Titgemeyer, E.C., Jonson, D. E. (2005). Effect of types of non-fiber carbohydrate on in vitro forage fiber digestion of low-quality grass hay. Anim Feed Sci Technol; 120:93–106.

6) Bach, B y Casalmigia, S. (2006). La fibra en los rumiantes ¿química o física? XXII Curso de especialización FEDNA. Barcelona 16 y 17 octubre de 2006. Pp99-113. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/manejo\\_del\\_alimento/100-fibra\\_en\\_rumiantes.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/100-fibra_en_rumiantes.pdf) Fecha de consulta: 15/6/2013.

7) Bargo F., Rearter D.H., Santini F.J., Muller L.D. (2001). Ruminant digestion by dairy cows grazing winter oats pasture supplemented with different levels and sources of protein. J Dairy Sci; 84:1777-1792.

8) Bargo F., Muller L.D., Delahoy J.E., Cassidy T.W. (2002a). Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. J Dairy Sci; 85:1777-1792.

9) Bargo F., Muller L. D., Varga G. A., Delahoy J. E., and Cassidy T. W. (2002b). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. J. Dairy Sci. 85:2964-2973.

10) Bargo, F. Muller, L. D. Kolver, E. S. Delahoy J. E. (2003) Invited Review: Production and Digestion of Supplemented Dairy Cows on Pasture. J Dairy Sci; 86:1–42

- 11) Bonifacino C. (2012). Búsqueda de agentes moduladores del rumen a partir de la quimioteca del laboratorio de química orgánica. Tesis de grado, Facultad de Ciencias (UdelaR) p. 44.
- 12) Britos, A., Mendoza, A., Claramunt, M., Karlen, M., Kelly, G., Magallanes, L., Ramirez, S., Zunini, A., Repetto, J.L., Cajarville, C., (2009) Effect of carbohydrate source on rumen fluid pH and in vitro gas production (GP) in heifers fed pasture silage. *J DairySci*; 92:152.
- 13) Britos A. (2012). Suplementación de forrajes de alta calidad con diferentes tipos de concentrados: Efectos sobre la fermentación ruminal. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria, UdelaR. p. 1-38.
- 14) Cajarville C., Aguerre M., Repetto J., (2006). Rumen pH, NH<sub>3</sub>-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim Res*; 55:511–520.
- 15) Cerrato M., Calsamiglia S., Ferret A. (2005). Efectos del tiempo a pH subóptimo y el número de ciclos sobre la fermentación microbiana ruminal en cultivo continuo. XI Jornadas sobre Producción Animal. p. 578-580. Disponible en: [http://www.aidaitea.org/images/files/jornadas/2005/TOMO%20II%20\(XXI%20jornadas\).pdf](http://www.aidaitea.org/images/files/jornadas/2005/TOMO%20II%20(XXI%20jornadas).pdf) Fecha de Consulta: 05/09/2012
- 16) Charlton G L, Rutter S M, East M, Sinclair L A. (2011). Effects of providing total mixed rations indoors and on pasture on the behavior of lactating dairy cattle and their preference to be indoors or on pasture. *J Dairy Sci*; 94:3875-3884.
- 17) Chenost, M, Aufrère, J, Macheboeuf, D. (2001). The gas-test technique as a tool for predicting the energetic value of forage plants. *Anim Res*; 50:349-364.
- 18) Cone J.W., van Gelder H.A., Visscher J.W., Oudshoorn L. (1996). Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim Feed Sci Technol*; 61:113-128.
- 19) Chilbroste P, Gibb M, Tamminga S. (2005). Pasture characteristics and animal performance. En: Dijkstra J., Forbes J., France J. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, 2nd edition. Wallingford, CAB International., UK. pp: 681-706.
- 20) Coppock, C.E., Bath, D.L., Harris, B. (1981). From feeding to feeding systems. *J DairySci*; 64:1230-1249.
- 21) DIEA, (2010). Anuario estadístico agropecuario. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,352,O,S,0,MNU;E;27;6;MNU> Fecha de consulta: 6/2/2013.

- 22) DIEA, (2012). Anuario estadístico agropecuario. Ministerio de Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, Uruguay. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgpp001.aspx?7,5,659,O,S,0,MNU;E;27;8;MNU;,.htm> Fecha de consulta: 6/2/2013.
- 23) Dillon P. (2006). Achieving high dry-matter intake from pasture with grazing dairy cows. En: Elgersma A., Dijkstra J., Tamminga S. Fresh herbage for dairy cattle .Springer.pp: 1-26.
- 24) Dixon R.M., Stockdale C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. Aust J Agric Res; 50: 757-773.
- 25) Elizalde J.C., Santini, F.J (1992). Factores nutricionales que limitan las ganancias de peso en bovinos durante el período otoño-invierno. Boletín Técnico, Vol. 104. EEA INTA. Balcarce, Argentina. 27 pp.
- 26) Elizalde J.C., Merchen N.R., Faulkner D.B. (1999). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: I. Effects on digestion of organic matter, fiber, and starch. J Anim Sci; 77:457-466.
- 27) Elizalde J.C. (2003) Alternativas de manejo para engorde de vacunos en sistemas pastoriles. XXXI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. p. 45-55.
- 28) Fondevila M., Barrios A. (2001). The gas production technique and its application to the study of the nutritive value of forages. Cuban J Agric Sci; 35: 187-196.
- 29) Ganzábal A., Ruggia A., De Miquelerena J. (2003). Producción de corderos en sistemas intensivos. INIA Series de actividades de difusión N° 342: 1-7
- 30) García S.C., Santini F.J., Elizalde, (2000). Sites of digestion and bacterial protein synthesis in dairy heifers fed fresh oats with or without corn or barley grain. J Dairy Sci; 83:746-755.
- 31) Getachew G, Blummel M, Makkar H.P, Becker K. (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Anim Feed Sci Technol; 72:261-281.
- 32) Gill M. (1979). The principles and practice of feeding ruminants on complete diets. Grass For Sci 34: 155-161.
- 33) Grant, R.J., Mertens, D.R. (1992). Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. J Dairy Sci; 75:2762-2768.
- 34) Hess B.W., Krysl L.J., Judkins M.B., Holcombe D.W., Hess J.D., Hanhs D.R, Huber S.A. (1996) Supplemental cracked corn or wheat bran for steers grazing endophyte-free fescue pasture: effects on live weight gain, nutrient quality, forage intake, particulate and fluid kinetics, ruminal fermentation, and digestion. J Anim Sci; 74:1116-1125.
- 35) Jarrige, R. Grenet E., Demarquilly C., Besle, J.M. (1995). Les constituents de l'appareil végétatif des plantes fourragères. En: Jarrige R., Ruckebusch Y.,

Demarquilly C., Farce M. H., Journet M. Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion. Paris, INRA. Eds. p. 25-81.

36) Khalili H., Sairanen A., (2000). Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Anim Feed Sci Technol*; 84:199.

37) Kolver E.S., (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proc Nut Soc*; 62:291–300.

38) Kolver E. S., Muller L. D., (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci*; 81(1): 1403-1411.

39) Mauricio, R.M, Mould, F.L, Dhanoa, M.S, Owen, E, Channa, K.S, Theodorou M.K. (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feed stuff evaluation. *Anim Feed Sci Technol*; 79:321-330.

40) McBee E. T., (1954). Organic Syntheses. An Annual Publication of Satisfactory Methods for the Preparation of Organic Chemicals. *J Am ChemSoc*; 76 (6):1714–1714

41) Mendoza A., Cajarville C., De la Quintana M., Garmendial E., Mutuberial E., De Torres E., Repetto J. L., (2011). Milk yield and composition of dairy cows fed diets combining pasture and total mixed ration. *J. Anim. Sci. Vol. 90, Suppl. 3/J. Dairy Sci; Vol. 95, Suppl. 2 .p. 249.*

42) Mc Donald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A., (2006). *Nutrición Animal*, 6a.ed. Zaragoza, Acribia, 587 p.

43) Menke, K.H, Steingass, H., (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumean fluid. *Anim Res Devel*. 28:7-55.

44) Noguera, R.R., Saliba, E.O., Mauricio, R.M. (2004). Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. *Livestock Res for Rural Develop*. 16 (11). Disponible en: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd16/11/nogu16086.htm> Fecha de consulta : 6/2/2013.

45) NRC, (2007). National Research Council. Nutrient Requirements if small Ruminants. The Academies, Washington, D.C.

46) Offner A., Bach A., Sauvant D., (2003). Quantitative review of *in situ* starch degradation in the rumen. *Anim Feed Sci Technol*; 106: 81-93.

47) Ørskov E.R., McDonald, I. (1979) The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to a rate of passage. *J Agric Sci (Cambridge)*; 92:499-503.

48) Pérez-Ruchel A., (2010). Tiempo y forma de acceso al forraje y uso de buffers levaduras: Efecto sobre el aprovechamiento digestivo de la dieta en ovinos. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 113p.

49) Pérez-Ruchel A., Repetto J.L., Cajaraville 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 AnimPhysiolAnimNutr*. DOI:10.1111/jpn.12008.

50) Piaggio L., Curbelo A., Corso C., (2003). Valor nutritivo de forrajes y reservas. Pastoreo. Primer Curso a Distancia para Profesionales sobre Nutrición de Rumiantes. Facultad de Veterinaria – MGAP/BID.

51) Pomiese N., (2010). Suplementación de Pastura templada de alta calidad con diferentes niveles de cebada, maíz o pulpa de citrus: Efecto de la producción de gas in vitro. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria; UdelaR. p 33.

52) Posada, S.L., Noguera, R.N. (2007) Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. Rev Col Cienc Pec; 20:141-148.

53) Rearte, D.H., Santini, F.J. (1989) Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. Rev Arg Prod Anim; 9:93-105.

54) Rearte, D.H., (1992). Alimentación y composición de la leche en los sistemas pastoriles. Balcarce CERBAS-INTA, 94 p.

55) Reis R.B., Combs D.K., (2000). Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. J Dairy Sci; 83:2888-2898.

56) Repetto J.L., Britos A., Cozzolino D., Errandonea N., Cajarville C., (2003). Nutritive value of Lucern and Fescue during autumn I: relationship between water soluble carbohydrates and nitrogen contents throughout the day. Proceedings of the IX World Conference on Animal Production, Porto Alegre, Brasil, p: 26.

57) Repetto J.L., Cajarville C., D'Alessandro J., Curbelo A., Soto C., Garin D., (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixture. Anim Res; 54:1-8.

58) Russell J.B., Hespell R.B. (1981). Microbial rumen fermentation. J Dairy Sci; 64:1153-1169.

59) 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.

60) 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.

61) Sandoval-Castro C.A., Capetillo-Leal C., Cetina-Gongora R., Ramirez-Aviles L. (2002). A mixture simplex design to study associative effects with an in vitro gas production technique. Anim Feed Sci Technol; 101:191–200.

62) Santana A., Ubilla J., Berrutti M., Konrath T., Aguerre M., Britos A., Cajarville C., Repetto J.L., (2011). Dry matter intake, ruminal pH and fermentation capacity of rumen fluid in heifers fed temperate pasture, total mixed rations or both. J Anim Sci; 89 (1): 511.

- 63) Sairanen A., Khalili H., Housiainen J.L., Ahvenjarvi S., Huhtanen P., (2005). The effect of concentrate supplementation on nutrient flow to the omasum in dairy cows receiving freshly cutgras. *J Dairy Sci*; 88:1443-1454.
- 64) SAS., (2002). Statistical Analysis Systems Institute. SAS Version 9.SAS.
- 65) Starr, C., Taggart, R., Ortega, M. T. A., (2004). Plantas C3 y plantas C4. En: Cengage Learning. *Biología: la unidad y la diversidad de la vida*. 10 ed.
- 66) Strobel, H.J. Russell J.B., (1986). Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. *J DairySci*; 69: 2941–2947.
- 67) Tebot I., (2008). Efecto de los suplementos ricos en energía sobre la función ruminal y el metabolismo del nitrógeno en ovinos alimentados con pasto fresco. Tesis de Maestría, Facultad de Veterinaria. UdelaR. 68p.
- 68) Tebot I., Cajaraville C., Repetto J.L., Cirio A., (2012). Supplementation with non-fibrous carbohydrates reduced fiber digestibility and did not improve microbial protein synthesis in sheep fed fresh forage of two nutritive values. *Animal* 6 (4): 617-623.
- 69) Theodorou, M.K, Williams, B.A, Dhanoa, M.S, Mc Allan, 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 Technol*; 48:185-197.
- 70) Tilley, J.M.A, Terry, R.A. (1963). A two stage technique for in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society*. 18:104-111.
- 71) Van Soest P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press, 2a ed. Ithaca, New York. 476p.
- 72) Van Vuren A.M., Van Der Koelen C.J., Vroons de Bruin J. (1993). Ryegrass versus corn starch or beet pulp fiber diet effects on digestion and intestinal amino acids in dairy cows. *J Dairy Sci*; 76:2692-2700.
- 73) Vibart R. E., Burns J. C., Fellner V. (2010) Effect of Replacing Total Mixed Ration with Pasture on Ruminal Fermentation. *Prof Anim Sci*; 26:435–442.
- 74) Williams, B.A. (2000) Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En: Givens, D.I., Owen, E., Omed, H.M., Axford, R.F.E. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. 475 p.
- 75) Williams B., Bosch M., Boer H., Verstegen M., Tamminga S., (2005). An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol*. 123–124:445–462.