



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Efecto del uso de aditivos en la fermentación ruminal y desempeño productivo durante el período transición y lactancia temprana en vacas lecheras en pastoreo

Lucas González Chappe

Maestría en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Animales

Junio, 2024

**Efecto del uso de aditivos en la
fermentación ruminal y desempeño
productivo durante el período transición
y lactancia temprana en vacas lecheras
en pastoreo**

Lucas González Chappe

Maestría en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Animales

Junio, 2024

Tesis aprobada por el tribunal integrado por el Ing. Agr. MSc. PhD. Alejandro Mendoza, la Ing. Agr. MSc. PhD. Virginia Beretta Ramírez y la Ing. Agr. MSc. PhD. Ana Inés Trujillo Lezama el 19 de julio de 2024. Autor: DMV. Lucas González Chappe. Director: Ing. Agr. MSc. PhD. Diego Mattiauda Mele.

Dedico este trabajo a mi abuelo y a toda mi familia, sin su apoyo nada sería posible. A Clara, a quien conocí en este camino y se volvió compañera de cada momento. Y a mis amigos, que, a pesar de las distancias, siempre están presentes.

Agradecimientos

Gracias a todas las personas que formaron parte de este trabajo.

A mis tutores, Diego y Magela, por compartir su conocimiento, por su esfuerzo y paciencia dedicados a mejorar el trabajo y mi formación.

A Paco, por estar siempre dispuesto a ayudar para que las cosas funcionen.

A Agustina, por todo el trabajo realizado, por compartir su experiencia y conocimientos del mundo académico.

A Fernando, por su apoyo y permanente ayuda durante su estadía.

A Lourdes y Manuela, por su trabajo constante antes y durante el experimento.

A León, por la ayuda brindada.

A Chili, Juan Pablo, Ana, Hugo, Graciana y Victoria, por compartir sus conocimientos, enseñar, exigir y dedicar tiempo para que el trabajo salga lo mejor posible.

A quienes fueron tesisistas de grado: Carolina, Lucía, Ana, Santiago, Clara y Tomás, por su enorme responsabilidad, por el trabajo realizado y por compartir horas de esfuerzo.

A los funcionarios de la EEMAC que colaboraron en el ensayo.

A Marisel, Aline y todo CCPA, por estar a la vanguardia en tecnologías necesarias en la producción animal y compartirlo.

Al grupo de lechería, por el constante intercambio.

A toda mi familia, que siempre me acompañó. A mis amigos. A Clara, por ayudarme en cada instancia.

Gracias a todos.

Tabla de contenido

página

Página de aprobación.....	III
Agradecimientos.....	V
Resumen.....	VIII
Summary.....	X
1. <u>Introducción</u>	1
1.1 Fermentación ruminal	2
1.1.1 <u>Ambiente y fermentación ruminal</u>	2
1.1.2 <u>Microbiota ruminal</u>	3
1.1.3 <u>Metabolismo de los nutrientes en rumen</u>	5
1.2 Modulación de la fermentación ruminal	8
1.2.1 <u>Ionóforos</u>	9
1.2.2 <u>Fitoquímicos</u>	14
2. <u>Hipótesis y objetivos del trabajo</u>	20
2.1 Hipótesis	20
2.2 Objetivo general	20
2.3 Objetivos específicos.....	20
3. <u>Materiales y métodos</u>.....	21
3.1 Diseño experimental y tratamientos	21
3.2 Muestreo y análisis químico de alimentos	25
3.3 Consumo	26
3.4 Producción y composición de leche.....	27
3.5 Fermentación ruminal	28
3.6 Análisis estadístico	29
4. <u>Resultados</u>.....	32
4.1 Consumo y condición corporal	32
4.1 Producción y composición de leche.....	33
4.2 Fermentación ruminal y protozoa	34
5. <u>Discusión</u>.....	43
5.1 Fermentación ruminal	46
6. <u>Conclusiones</u>.....	50

7.	<u>Bibliografía</u>	51
8.	<u>Anexos</u>	69
8.1	Producción de leche diaria estimada con un modelo estadístico diferente.....	69
8.2	Phytochemicals and monensin in dairy cows: impact on productive performance and rumen fermentation profile.....	70

Resumen

Se realizó un experimento para evaluar los efectos de monensina sódica o de una mezcla de fitoquímicos como moduladores de la fermentación ruminal en vacas lecheras en transición. En un diseño completamente al azar, treinta y seis vacas Holstein multíparas y veinticuatro primíparas (nueve fistuladas con cánulas ruminales) fueron asignadas a uno de tres tratamientos: un grupo control sin aditivos (CTL), 0,300 g/vaca/día de monensina sódica (MON) o 50 g/vaca/día de una asociación de fitoquímicos derivados de plantas (PHY; CCPA®, Francia), en una dieta totalmente mezclada (DTM) desde los 30 días antes del parto hasta 60 días posparto. Durante el postparto las vacas tuvieron un turno de pastoreo. Se evaluó el consumo de materia de seca (CMS) preparto y posparto, la producción y la composición de la leche y la fermentación ruminal en tres períodos: 7 días antes del parto, 30 y 60 días después del parto. En primíparas, el CMS preparto fue menor en el tratamiento MON en comparación con PHY y CTL. La producción de leche fue mayor en las vacas primíparas suplementadas con PHY y MON en comparación con CTL (28,5 y 28,7 vs $26,5 \pm 0,76$ kg/d, respectivamente), al igual que el porcentaje de lactosa (4,88 vs 4,99, $5,00 \pm 0,05\%$), sin afectar otras variables. En el preparto y durante el postparto ambos aditivos disminuyeron el número de protozoos. En el posparto la proporción de propionato fue mayor y la relación de cetogénicos:glucogénicos menor en el período 60 en el grupo PHY en comparación con CTL, mientras que MON fue intermedio. Las concentraciones de butirato y amonio ruminal fueron menores en PHY, mientras, que valerato fue más bajo en las vacas suplementadas con MON. El perfil de fermentación ruminal fue afectado por el estado fisiológico, la dieta consumida y la suplementación con PHY y MON. Bajo las condiciones del estudio, incluir MON o PHY en la dieta puede mejorar la producción en primíparas debido a los efectos positivos en el rumen, siendo estas condiciones más estables en las vacas suplementadas con PHY.

Palabras clave: fitoquímicos, monensina, rumen, vacas Holstein

Effect of the use of additives on ruminal fermentation and productive performance during the transition period and early lactation in grazing dairy cows

Summary

An experiment was conducted to evaluate the effects of sodium monensin or a mixture of phytochemicals as modulators of ruminal fermentation in transition dairy cows. In a completely randomized design, thirty-six multiparous Holstein cows and twenty-four primiparous cows (nine fistulated with rumen cannulas) were assigned to one of three treatments: a control group without additives (CTL), 0.300 g/cow/day of sodium monensin (MON), or 50 g/cow/day of a blend of plant-derived phytochemicals (PHY; CCPA®, France), in a total mixed ration (TMR) from 30 days before calving to 60 days postpartum. During the postpartum period, the cows had a grazing period. Prepartum and postpartum dry matter intake (DMI), milk production and composition, and ruminal fermentation were evaluated in three periods: 7 days before calving, 30, and 60 days after calving. In primiparous cows, prepartum DMI was lower in the MON treatment compared to PHY and CTL. Milk production was higher in primiparous cows supplemented with PHY and MON compared to CTL (28.5 and 28.7 vs. 26.5 ± 0.76 kg/day, respectively), as well as lactose percentage (4.88 vs. 4.99, $5.00 \pm 0.05\%$), without affecting other variables. In the prepartum and postpartum periods, both additives decreased the number of protozoa. Postpartum, the proportion of propionate was higher, and the ketogenic: glucogenic ratio was lower in the 60-day period in the PHY group compared to CTL, while MON was intermediate. Butyrate and ruminal ammonium concentrations were lower in PHY, while valerate was lower in cows supplemented with MON. The ruminal fermentation profile was affected by the physiological state, the diet consumed, and supplementation with PHY and MON. Under the study conditions, including MON or PHY in the diet may improve production in primiparous cows due to positive effects in the rumen, with these conditions being more stable in cows supplemented with PHY.

Keywords: phytochemicals, monensin, rumen, Holstein cows.

1. Introducción

La monensina es el antibiótico más utilizado en la dieta del ganado lechero para mejorar la producción y eficiencia alimenticia (Ranga Niroshan Appuhamy et al., 2013). Sin embargo, su uso como aditivo nutricional ha sido descontinuado en la comunidad europea (Regulación 1831; Comisión Europea) y también rechazado socialmente, debido a la preocupación pública respecto al uso de antibióticos en la producción de alimentos y a la aparición de enfermedades zoonóticas causadas por cepas resistentes (Benchaar et al., 2008).

A raíz de esto, se ha impulsado la investigación y comercialización de derivados de plantas y microorganismos en la producción animal, compuestos nutraceuticos con efectos positivos en la salud y productividad de rumiantes (Oh et al., 2017). Trabajos *in vitro* han demostrado que compuestos como los aceites esenciales aumentan la producción de propionato (C3), reducen la producción de acetato (C2) y metano (CH₄) e inhiben la proteólisis y la desaminación en rumen (Calsamiglia et al., 2007; Chaves et al., 2008). Además, varios reportan que estos aumentan la producción de leche (Kung et al., 2008; Tassoul y Shaver, 2009) y tienen actividad antioxidante, antimicrobiana o antiinflamatoria (Özkaya et al., 2022).

Sin embargo, los efectos del uso de estos aditivos dependen del tipo de dieta suministrada a los animales y los resultados de trabajos existentes no siempre son comparables con las condiciones de producción de Uruguay. Estos se han evaluado principalmente en sistemas de confinamiento con dietas totalmente mezcladas (DTM) (Calsamiglia et al., 2007), lo que difiere de las condiciones de sistemas lecheros locales, donde un 50 % de la dieta proviene de la cosecha directa de forraje, lo que es un factor esencial para disminuir costos de producción y mejorar la rentabilidad (Fariña y Chilibroste, 2019). Es por esto que surge la necesidad de evaluarlos en sistemas mixtos con inclusión de pasturas, típicos de Sudamérica.

El propósito de este trabajo es evaluar el efecto de la utilización de fitoquímicos vegetales compuestos por polifenoles (hasta 450 ppm), curcuminoides (hasta 280 ppm), piperina (hasta 15 ppm) y trans-cinamaldehídos (hasta 1000 ppm) (Grupo CCPA, Francia) y monensina sobre el consumo de alimento, condición corporal, producción y composición de leche, parámetros de fermentación ruminal y población de protozoarios, en vacas lecheras durante el período de transición y lactancia temprana, en sistemas pastoriles mixtos.

1.1 Fermentación ruminal

Los rumiantes han desarrollado adaptaciones anatómicas que les confieren la particularidad de utilizar un componente que el hombre no puede digerir: la lignocelulosa, el complejo de polímero de carbonos más abundante en la tierra y una enorme reserva de energía. Gracias a esta singularidad, el rumiante es capaz de convertir la biomasa vegetal en proteína de alto valor biológico para el ser humano.

1.1.1 Ambiente y fermentación ruminal

El rumen proporciona un hábitat ideal para microorganismos: presenta una temperatura constante de 36-40 °C, un contenido de materia seca de 10-13 % y un pH fisiológico de 5,5 a 7 (Choudhury et al., 2015). El agua consumida por los animales, junto con la saliva, crean el ambiente húmedo necesario para el crecimiento microbiano. El consumo de alimento provee energía y nutrientes para el crecimiento y actividad microbiana, mientras que la actividad motora normal del rumen y retículo facilita la mezcla del contenido en su interior (Owens y Basalan, 2016).

El rumen es un ambiente anaeróbico con una fase gaseosa compuesta principalmente por dióxido de carbono (CO₂; 65 %) y CH₄ (35 %), con un potencial redox de -150 a -350 mV (Huang et al., 2018). Por lo tanto, el metabolismo que tiene lugar en el rumen es principalmente fermentativo, donde el aceptor final de electrones no es el oxígeno, sino que son compuestos orgánicos e inorgánicos; es así como puede definirse la

fermentación en el rumen como una oxidación incompleta, donde los aceptores finales son compuestos de carbono formados en el propio proceso (Choudhury et al., 2015). Durante la fermentación, los ácidos y otros productos finales son absorbidos vía sangre o linfa, o neutralizados o removidos a través de la eructación.

El rumen cuenta con la capacidad de retener alimentos fibrosos durante períodos prolongados, lo que permite así una fermentación adecuada de la pared celular vegetal y la conversión de esta materia vegetal en ácidos grasos volátiles (AGV; principalmente C2, C3 y butírico: C4), la mayor fuente energética de los rumiantes. A su vez, al facilitar el crecimiento y producción de microorganismos, la fermentación provee aminoácidos microbianos al hospedador. Sin embargo, la fermentación tiene determinadas restricciones: 1) existen productos de la fermentación como el CH₄ y el CO₂, los cuales son eliminados a la atmósfera y representan una pérdida de energía, además de tener un impacto ambiental negativo, ya que su producción contribuye al calentamiento global (Ungerfeld, 2018); 2) la energía producida a partir de los sustratos (moles de ATP/mol de glucosa) es considerablemente baja, lo que conlleva una rápida captación de esta energía por los microorganismos para sostener su crecimiento (Owens y Basalan, 2016).

1.1.2 Microbiota ruminal

La particularidad de los rumiantes es posible gracias a la simbiosis que mantienen con los microorganismos del rumen. La población del rumen está integrada por una amplia diversidad taxonómica, incluidos procariotas (bacterias y arqueas), eucariotas (protozoarios y hongos ciliados anaerobios), y vida no celular (virus; Firkins y Yu, 2015). Esta diversidad define dos propiedades ecológicas de la comunidad microbiana del rumen: redundancia (superposición de funciones entre múltiples especies) y resiliencia (resistencia a las perturbaciones y capacidad para recuperarse de ellas), lo que garantiza una gran estabilidad en la función digestiva en diversas condiciones de alimentación y manejo, pero también representa una limitante para mejorar la función ruminal (Weimer, 2015).

El microbioma del rumen es caracterizado por una alta población y extensa diversidad de bacterias ruminales que alberga más de 7000 especies (Firkins y Yu, 2015). La comunidad bacteriana del rumen está conformada principalmente por bacterias gramnegativas (80-90 %), aunque la proporción de bacterias grampositivas puede aumentar (20-30 %) en dietas ricas en granos (Nagaraja, 2016). A su vez, basados en su distribución en el rumen, las bacterias se pueden clasificar en bacterias que flotan libres en líquido ruminal y bacterias que se encuentran adheridas a partículas de alimentos, protozoarios, esporangios de hongos o células epiteliales (Matthews et al., 2019). Aquellas libres en el líquido ruminal son aproximadamente el 30 % de las bacterias totales (Owens y Basalan, 2016).

Se identifican diferentes grupos funcionales, como celulíticos, hemicelulolíticos, amilolíticos, proteolíticos y lipolíticos (Firkins & Yu, 2015), aunque muchos organismos pueden tener funciones que atraviesan estos nichos. El aporte permanente de sustrato promueve esta presión selectiva, lo que lleva a la diferenciación de estos nichos. Además, se puede identificar un microbioma central, que suele incluir los microorganismos encargados de degradar carbohidratos complejos (Firkins & Yu, 2015).

Los protozoarios ruminales también son anaeróbicos y constituyen cerca del 50 % de la biomasa ruminal. Los ciliados componen la mayoría de protozoo en el rumen y son los de mayor importancia. Se clasifican en dos tipos: entodiniomórfidos y holotricos (Williams y Coleman, 1992). Los protozoarios holotricos son principalmente consumidores de azúcares solubles. El género entodiniomórfidos consume una gran variedad de compuestos, teniendo la capacidad de digerir pared celular, almidón y proteínas (Choudhury et al., 2015). A su vez, realizan depredación de bacterias y atrapan partículas de alimentos, lo que incide en el metabolismo energético y proteico del rumen (Williams y Coleman, 1992).

Los protozoarios son responsables de 30-40 % de la degradación de la fibra, ya que participan en las etapas iniciales de la colonización y digestión de esta (Choudhury et al., 2015). Por esta razón, la defaunación se ha

asociado a disminuciones de la degradación de la materia orgánica (MO) (Newbold et al., 2015). Otro resultado de la defaunación es el aumento del flujo de proteína microbiana al duodeno por menor depredación de bacterias que da lugar a mayor biomasa bacteriana (Newbold et al., 2015). Debido a su relación simbiótica con los metanógenos, la defaunación podría reducir la producción de CH₄, ya que los metanógenos asociados a protozoarios son responsables de hasta el 37 % de la producción de CH₄ entérico (Williams y Coleman, 1992). A su vez, uno de los hallazgos más consistentes en animales defaunados es la disminución en las concentraciones de amonio (NH₄; -27 %) ocasionada por una menor degradación y digestibilidad de las proteínas en ausencia de protozoarios ruminales (Newbold et al., 2015).

Las arqueas ruminales son microorganismos anaeróbicos estrictos y producen CH₄ a partir de CO₂ y di hidrogeniones (2H). El dominio de arquea encontrado en el rumen es el de *Euryarchaeota*, que consta de arqueas metanógenas. Los metanógenos cumplen un rol fundamental en el rumen mediante la eliminación de hidrogeniones. El hidrógeno es uno de los principales productos finales de la fermentación y es captado por las metanógenas para reducir CO₂ y otro compuesto de un carbono a través de la vía de hidrogenotrófica a CH₄ (Beauchemin et al., 2020).

1.1.3 Metabolismo de los nutrientes en rumen

Los principales componentes de la dieta de rumiantes son polímeros que incluyen carbohidratos, compuestos nitrogenados (proteicos y no proteicos), lípidos y lignina. Los polímeros, excepto la lignina, son metabolizados a monómeros que luego son fermentados a varios productos.

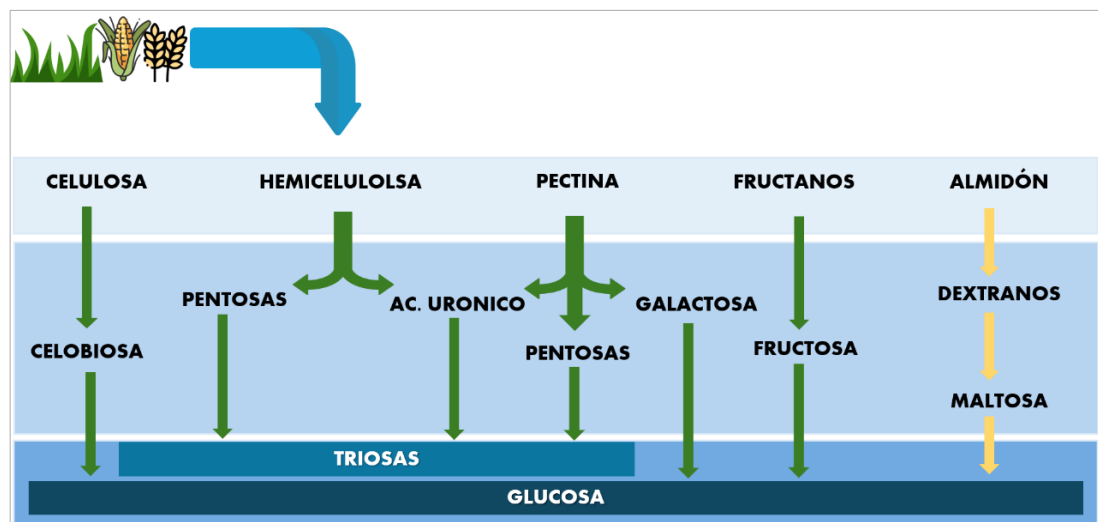
Los carbohidratos pueden ser estructurales (celulosa, hemicelulosa) o no estructurales (almidón, azúcares simples, fructosa; Owens y Basalan, 2016). La fermentación de carbohidratos estructurales se da principalmente por bacterias del género *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* (Saha y Pathak, 2021). La degradación de carbohidratos se puede dividir en dos etapas principales, la primera es la digestión de carbohidratos complejos a azúcares simples, donde las bacterias

utilizan enzimas extracelulares. La celulosa es descompuesta a celobiosa, que luego es convertida en glucosa, mientras que la hemicelulosa es digerida por la vía de las pentosas principalmente (figura 1).

El almidón y los azúcares solubles (pectina o fructanos) son fermentados principalmente por bacterias del género *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis* y especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Figura 1

Conversión ruminal de polímeros a azúcares simples para su fermentación.



Nota. Adaptado de Ruminology (2016).

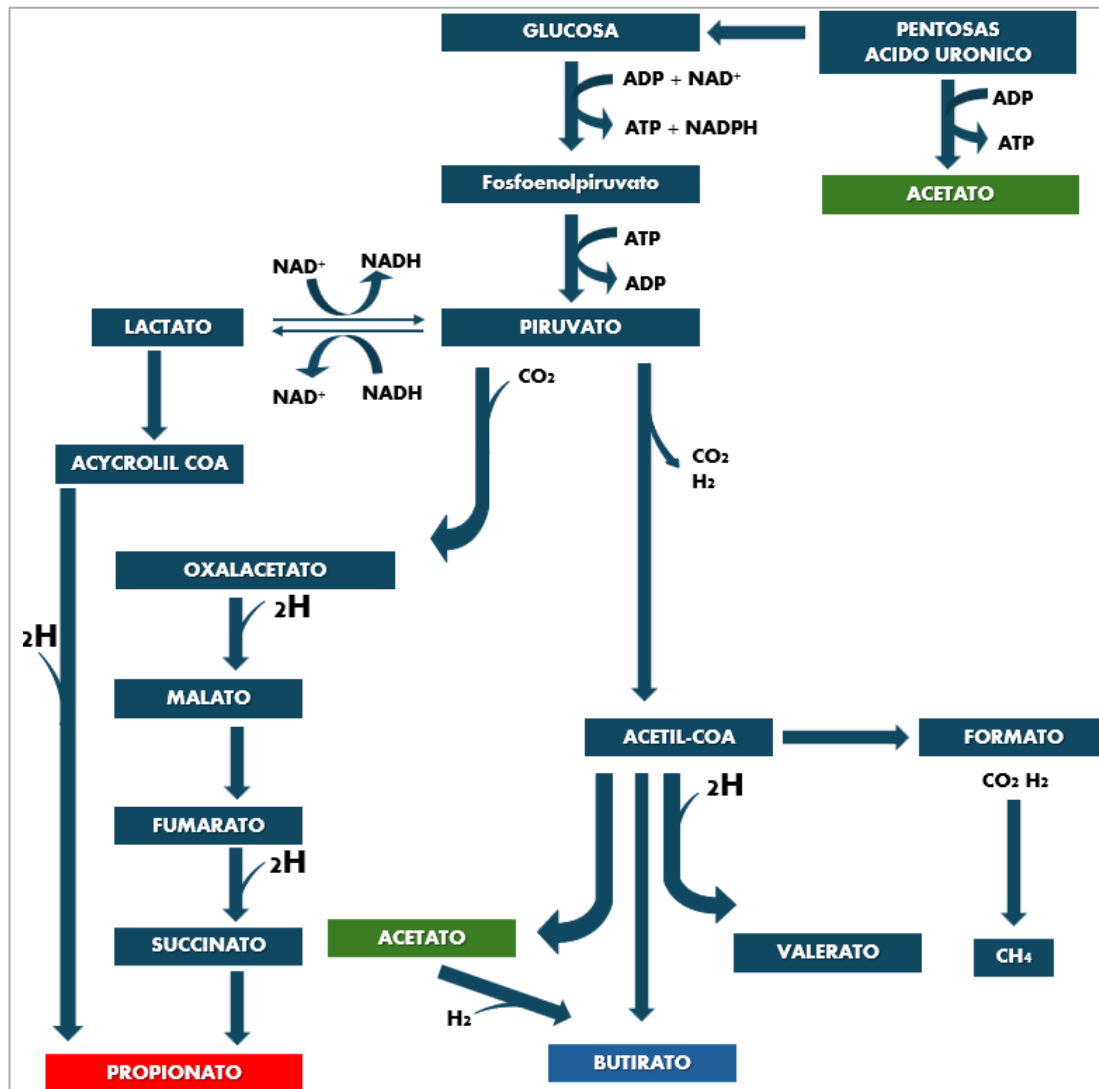
Un 40 a 90% del almidón es degradado en el rumen a una tasa de degradación variable que depende del acceso que tengan las bacterias a los gránulos del almidón y, a su vez, del tipo de almidón y el tiempo de retención de este en el rumen. El almidón es primero convertido en maltosa y luego a glucosa (Owens y Basalan, 2016).

Los azúcares simples producidos en la primera fase de la digestión de los carbohidratos pocas veces son detectados en el líquido ruminal, ya que estos son tomados rápidamente y metabolizados de manera intracelular por los microorganismos. En este segundo estadio de digestión, las vías utilizadas son similares a las del hospedador. El intermediario clave, que une estas dos

etapas, es el piruvato (Owens y Basalan, 2016). La figura 2 muestra las vías por la cual se une el piruvato a los principales productos de la digestión de los carbohidratos en el rumen, que son C2, C3, C4, CO₂ y CH₄.

Figura 2

Vías metabólicas de la fermentación ruminal.



Nota. Adaptado de Firkins (2021).

Las proteínas del alimento se clasifican en dos tipos, proteína no degradable en rumen (PNDR) y proteína degradable en rumen (PDR). La PNDR es la fracción que no sufre cambios durante el pasaje por el rumen y es digerida intestinalmente parcial o totalmente. La PDR es utilizada y degradada

por los microorganismos ruminales a polipéptidos, luego a péptidos, aminoácidos y NH_4 , productos que son utilizados por las bacterias para la producción de proteína microbiana. El líquido ruminal tiene pocos aminoácidos libres, lo que sugiere que los aminoácidos son fermentados de manera rápida en rumen. La desaminación es probablemente el método más común de fermentación de los aminoácidos (Owens y Basalan, 2016). Este proceso puede ser realizado por un pequeño número de bacterias especializadas llamadas bacterias hiper-amonioantes (HAP) o por bacterias que tienen poca actividad de desaminación, pero están en gran número en el rumen. También, los protozoarios ciliados tienen un rol importante en la degradación y desaminación de las proteínas. El enfoque para mejorar la eficiencia de utilización del nitrógeno ha sido modificar el número y actividad de bacterias HAP o las poblaciones de protozoarios ruminales.

1.2 Modulación de la fermentación ruminal

La formación y liberación de CH_4 al ambiente, así como la baja utilización de nitrógeno por parte de los rumiantes, representan una gran pérdida de energía para los animales y los sistemas lecheros (Calsamiglia et al., 2010; Moss et al., 2000) y, además, constituyen una fuerte fuente de contaminación ambiental. Por esta razón, se han investigado y empleado antibióticos, enzimas, agentes desfaunantes y varios aditivos químicos para manipular la fermentación ruminal y reducir estas pérdidas. Así, la manipulación de la fermentación ruminal surge como una herramienta para mejorar la eficiencia de producción, la productividad del animal y la calidad del producto, mediante la alteración de la microbiota ruminal y la promoción de vías de fermentación más eficientes (Ahmed Soltan y Kumar Patra, 2022).

En este contexto, existen tres áreas principales de estudio que buscan mejorar la eficiencia, incidiendo en diferentes procesos: la mejora en la degradación del alimento mediante el uso de enzimas, microorganismos genéticamente modificados o microorganismos vivos como bacterias y hongos; la disminución de la pérdida de energía a través de la inhibición de la producción de metano o la degradación de proteínas, utilizando, por ejemplo,

algas rojas, 3-NOP o taninos; y la mejora de la eficiencia energética y proteica del rumen a través de la inhibición selectiva de la microbiota ruminal, por ejemplo, mediante el uso de antibióticos o fitoquímicos.

Los ionóforos son un grupo de antibióticos muy difundido y utilizados para mejorar la eficiencia a través de la modificación del metabolismo energético y nitrogenado, así como la reducción de patologías como acidosis y meteorismo (Duffield et al., 2008b; Ipharraguerre y Clark, 2003). Sin embargo, en los últimos años se ha prohibido o discontinuado el uso de varios antibióticos promotores del crecimiento por tener uso terapéutico, tanto humano como veterinario, y, por ende, correr el riesgo de disminuir la eficacia de este por la generación de resistencia (Grande et al., 2000). Por esta razón, y por la menor aceptación social debido a la aparición de residuos y cepas resistentes, se han evaluado constantemente alternativas al uso de estos, como es el caso de los aceites esenciales, levaduras, probióticos y otros aditivos derivados de plantas (Calsamiglia et al., 2007).

1.2.1 Ionóforos

Los ionóforos son antibióticos poli éter que actúan como inhibidores de bacterias. Son compuestos altamente lipofílicos que tienden a acumularse en las membranas y modificar el transporte iónico, ya que pueden actuar como transportadores de diferentes iones y protones a través de la membrana celular (Ipharraguerre y Clark, 2003). La monensina, producida a partir de la fermentación de *Streptomyces cinnamonensis*, es el antibiótico ionóforo de mayor utilización actualmente. Su uso se ha asociado con una mejora en el metabolismo ruminal y energético del animal, así como con la salud del ganado lechero. Este efecto está relacionado con un mayor crecimiento de bacterias gramnegativas sobre las grampositivas y protozoarios (Odongo et al., 2007), lo que promueve una mayor fermentación propiónica en el rumen y, consecuentemente, una mejora en el aporte de precursores glucogénicos y la captura de energía ruminal (Firkins, 2021). En la tabla 1 se muestran las principales respuestas productivas a la suplementación con monensina en ganado lechero.

La respuesta a la suplementación con monensina ha sido variable según la bibliografía reportada (Tabla 1), lo cual se explica por diferentes factores, como la dosis utilizada, el estado fisiológico de los animales, la dieta base y el poder estadístico del ensayo (Duffield et al., 2008b). Los metaanálisis realizados por Duffield et al. (2008a, b) y, más recientemente, por Rezaeei Ahvanoei et al. (2023) confirman una mejora en la producción y salud del ganado lechero cuando se suplementa con monensina con dosis de 0.250-0.350 g/d.

Tabla 1

Respuestas productivas a la suplementación con monensina en ganado lechero

Autor	CMS	Producción	Eficiencia	Grasa		Proteína		Lactosa		CC
	kg/d	kg/d	Producción/CMS	%	kg/d	%	kg/d	%	kg/d	
Phipps et al. (2000)	↓	↑	↑	↓	≈	↓	≈	≈	≈	≈
Ruiz et al. (2001)	≈	↑	↑	≈	↓	≈	↓	≈	≈	≈
Erasmus et al. (2005)	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Eifert et al. (2005)	≈	≈	≈	≈	≈	↑	≈	≈	≈	≈
Benchaar et al. (2006)	≈	≈	≈	↓	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Odongo et al. (2007)	≈	≈	≈	↓	≈	↓	≈	≈	≈	≈
Yang et al. (2007)	≈	≈	≈	↓	↓	≈	≈	≈	≈	≈
Chung et al. (2008)	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Mathew et al. (2011)	≈	≈	≈	≈	↓	≈	≈	≈	≈	≈
Mullins et al. (2012)	≈	≈	≈	-	-	-	-	-	-	-
Akins et al. (2014)	≈	↑	↑	≈	≈	↓	↑	≈	↑	≈
Do Prado et al. (2015)	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Drong et al. (2015)	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
McCarthy et al. (2015)	↑	↑	≈	≈	≈	≈	≈	↓	≈	≈
Benchaar et al. (2016)	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Ghizzi et al. (2018)	↓	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Costa et al. (2020)	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	-
Silva et al. (2021)	↓	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Grigoletto. (2021)	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈

Nota. CMS: consumo de materia seca; CC: condición corporal.

La respuesta a la suplementación con monensina mejora en la producción de leche en un 2,3 % y reduce el consumo de materia seca (CMS) en un 2,3 %, lo que resulta en una mayor eficiencia de alimentación (+2,5 %) (Duffield et al., 2008b; Rezaei Ahvanooei et al., 2023). Además, se ha observado una reducción de las cetonas y un aumento de los niveles de glucosa en sangre (Duffield et al., 2008a), lo que contribuye a una mayor prevención de enfermedades metabólicas. Las respuestas productivas a su suplementación son consistentes con las principales observaciones sobre su efecto en la fermentación ruminal (tabla 2), particularmente el aumento en las concentraciones de C3 (Drong et al., 2016; Erasmus et al., 2005; Green et al., 1999). Además, diversos estudios han señalado que la suplementación con monensina podría incrementar la frecuencia de alimentación del ganado, lo que generaría una mayor estabilidad en el ambiente ruminal.

Tabla 2

Respuestas en parámetros ruminales con la suplementación de monensina en ganado lechero

Autor	pH	NH4	AGV	C2	C3	C2:C3	C4	C5	ISOC4	ISOC5	PROTOZOA
<i>Green et al. (1999)</i>	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
<i>Ruiz et al. (2001)</i>	≈	≈	≈	≈	≈	↓	≈	-	-	-	-
<i>Mutsvangwa et al. (2002)</i>	≈	-	≈	≈	≈	↓	≈	≈	≈	≈	-
<i>Erasmus et al. (2005)</i>	≈	≈	≈	≈	↑	≈	≈	↑	-	-	-
<i>Benchaar et al. (2006)</i>	≈	↓	≈	≈	≈	≈	≈	-	-	-	≈
<i>Yang et al. (2007)</i>	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
<i>Mullins et al. (2012)</i>	≈	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Do Prado et al. (2015)</i>	≈	≈	≈	≈	↑	≈	↓	≈	↑	≈	-
<i>Drong et al. (2016)</i>	≈	≈	≈	≈	↑	↓	↓	↓	≈	≈	≈
<i>Benchaar (2016)</i>	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	↑	↑	≈
<i>Ghizzi et al. (2018)</i>	≈	≈	≈	≈	≈	≈	-	-	≈	≈	-
<i>Santos et al. (2019)</i>	≈	≈	≈	≈	↑	↓	≈	-	-	-	-
<i>Mezzetti et al. (2019)</i>	≈	↓	≈	≈	≈	≈	≈	↓	↓	↓	-
<i>Silva et al. (2021)</i>	↓	↑	≈	≈	≈	≈	≈	-	-	-	-

Nota. NH4, amonio ruminal; AGV, ácidos grasos volátiles totales; C2, ácido acético; C3, ácido propiónico; C4, ácido butírico; C5, valérico; ISOC4, isobutírico; ISOC5, isovalérico; PROTOZOA, población de protozoarios.

1.2.2 Fitoquímicos

Las plantas producen una extensa síntesis de compuestos orgánicos, conocidos como fitoquímicos, a través de su metabolismo secundario. Estos desempeñan importantes funciones ecológicas y frecuentemente exhiben capacidades antimicrobianas contra una amplia gama de bacterias, levaduras y mohos (Calsamiglia et al., 2007). Generalmente se pueden estructurar en 3 grupos: aceites esenciales, saponinas y polifenoles; sus propiedades los hacen atractivos como posibles aditivos alimentarios capaces de influir en la dinámica de la fermentación ruminal, en busca de mejorar la eficiencia alimenticia y la salud animal (Benchaar et al., 2008).

Su utilización ha alterado la fermentación ruminal mediante modificaciones en la microbiota ruminal, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Cardozo et al., 2004; Kholif y Olafadehan, 2021). Debido a esto, en los últimos años, grandes esfuerzos se han realizado para encontrar combinaciones que tengan efectos positivos en la salud y desempeño del ganado bovino. El impacto sobre el CMS depende de la composición de la dieta, siendo una respuesta variable entre ensayos (Kholif y Olafadehan, 2021; tabla 3). Se han observado cambios positivos en la producción y eficiencia alimenticia con el uso de fitoquímicos (Rodrigues et al., 2019; Tassoul y Shaver, 2009), aunque, por el contrario, Khiaosa-ard y Zebeli (2013), en su metaanálisis, no detectaron cambios en la producción de leche. Los efectos de los fitoquímicos también exhiben una respuesta dependiente de la dosis: concentraciones más bajas conducen a respuestas modestas en contraste con concentraciones más altas, que pueden tener efectos positivos o negativos si la dosis no es bien ajustada. Por tanto, la interacción entre la dieta, el tipo de aditivo y la dosis gobierna el efecto resultante (Kholif y Olafadehan, 2021). Además, se han observado efectos aditivos, antagónicos y sinérgicos con el uso de diferentes compuestos fitoquímicos mixtos (Chaves et al., 2008). En consecuencia, diversas combinaciones de diferentes principios activos pueden producir efectos diferentes.

Tabla 3

Respuestas productivas a la suplementación fitoquímicos en vacas lecheras.

<i>Autor</i>	<i>Fitoquímico</i>	<i>Dosis</i>	<i>CMS</i>	<i>Producción</i>	<i>Eficiencia</i>	<i>Grasa</i>		<i>Proteína</i>		<i>Lactosa</i>		<i>CC</i>
			kg/d	kg/d	Producción/CMS	%	kg/d	%	kg/d	%	kg/d	
Benchaar et al. (2006)	CRINA	2 ¹	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	↑
Spanghero et al. (2009)	-	0,24 0,64 1 ¹	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Tassoul y Shaver (2009)	CRINA	1,2 ¹	↓	≈	≈	≈	≈	↓	≈	≈	≈	≈
Santos et al. (2010)	E, acetato de geranilo, cilantro		≈	≈	≈	↑	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Tager y Krause (2011)	E Y C	0,5 g/d 10 ¹	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Flores et al. (2013)	E y C	200 400 600 ²	-	≈	-	≈	≈	≈	≈	≈	≈	↑
Tekippe et al. (2013)	E y C	525 ²	≈	≈	↑	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Tekkipe et al. (2013)	C y E	525 ²	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Wall et al. (2014)	C y E	350 ²	↑	↑	≈	≈	≈	↑	↑	≈	≈	-
Benchaar (2016)	78 % C	50 ²	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Benchaar (2016)	98 % C	50 ²	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Drong et al. (2016)	CRINA	1 ¹	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Zhan et al. (2017)	Flavonoides	20 60 ²	≈ ↑	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	-
Silva et al. (2018)	CRINA	44 ³	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Kolling et al. (2018)	Extractos de orégano	0,056 ⁴	≈	≈	≈	-	-	-	-	-	-	-
Kolling et al. (2018)	Extractos de té verde	0,028 ⁴	≈	≈	≈	-	-	-	-	-	-	-
Kolling et al. (2018)	Orégano y té verde	0,056 ⁴	≈	≈	≈	-	-	-	-	-	-	-

Oh et al. (2018)	C, E, Capsicum	1 ¹	≈	≈	↑	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Rodrigues et al. (2019)	Taninos condensados, C, curcumina, capsaicina, piperina	30 ¹	-	↑	-	≈	↑	≈	≈	≈	↑	↓
Braun et al. (2019)	Mentol, E, anetol	1,2 ¹	≈	↑	↑	≈	↑	≈	↑	-	-	-
Chapman et al. (2019)	C	0 2 4 ⁵	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Elcoso et al. (2019)	Agolin	200 ²	≈	↑	↑	≈	≈	≈	≈	-	-	-
Silva et al. (2020)	Capsaicina, carvacrol, C, E	150 ³	↓	↑	↑	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Kholif et al. (2021)	Mentol, B-linalool, p-mentano, levomentol, anetole, ácido hexadecanoico	3 6 ¹	↑ ↓	↑ ↓	≈	↑ ≈	↑ ≈	↑ ≈	↑ ≈	↑ ↓	↑ ↓	-
Silvestre et al. (2022)	Capsaicina, E	200 300 600 ²	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Rossi et al. (2022)	Clavo de olor, cilantro, geranio, taninos, bioflavonoides	10 ¹	↓	↑	↑	≈	≈	≈	≈	≈	≈	-
Silvestre et al. (2023)	Acetato de geranilo, E	1 ¹	≈	≈	≈	↑	≈	≈	≈	↑	≈	≈
Cantet et al. (2023)	C	125 ²	↓	≈	↑	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Cantet et al. (2023)	C, aceite de ajo	135 ²	↓	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Bach et al. (2023)	E, acetato de geranilo, cilantro	1 ¹	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Van Den Bossche et al. (2024)	CRINA		≈	≈	↑	≈	≈	≈	≈	≈	-	≈

Nota. CMS, consumo de materia seca; CC, condición corporal; CRINA, timol, eugenol, vanillin y limoneno; AGOLIN, mentol, timol, eugenol; C, cinamaldehído; E, eugenol; ¹g/d; ²mg/d; ³mg/kg MS; ⁴% MS; ⁵mg/kg PV.

En la tabla 3 se presentan 27 estudios sobre la suplementación de ganado lechero con diversos aditivos fitoquímicos. Solo un trabajo (Flores et al., 2013) incluye pasturas cosechadas directamente por el animal en su dieta y es el único del cual tenemos conocimiento, lo que resalta la importancia de evaluar estos aditivos dentro de los sistemas típicos de América del Sur, donde una porción sustancial de la dieta del animal proviene de la pastura. Además, solamente cuatro trabajos son realizados con vacas durante el período de transición (Drong et al., 2016; Tassoul y Shaver, 2009) o durante el inicio de la lactancia (<60 días en lactancia; DEL; Kholif et al., 2021; Santos et al., 2010). Esto resalta la importancia de evaluar estos aditivos durante un período crítico para la vaca lechera, en el cual el rumen y el metabolismo deben adaptarse constantemente a nuevas condiciones.

Tabla 4

Respuestas en parámetros ruminales observadas con la suplementación de fitoquímicos en vacas lecheras.

Autor	Principio activo	Dosis	pH	NH4	AGV	C2	C3	C4	C5	ISOC4	ISOC5	Protozoa
Benchaa et al. (2006)	CRINA	2 ¹	↑	≈	≈	≈	≈	≈	-	-	-	≈
Trager and Kruse. (2011)	C	0,5 10 ¹	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	-
Giannenas et al. (2011)	CRINA	220 ²	≈	≈	≈	≈	↑	≈	≈	≈	≈	≈
Flores et al. (2013)	E, C	200 400 600 ²	≈	-	≈	≈	≈	↑ ≈ ↓	-	-	-	-
Tekkipe et al. (2013)	E, C	525 ²	≈	↑	≈	≈	≈	≈	≈	↑	↑	≈
Tekkipe et al. (2013)	E, C	525 ²	≈	≈	≈	≈	≈	≈	↓	↑	≈	-
Benchaa et al. (2016)	78 % C	50 ²	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Benchaa et al. (2016)	98 % C	50 ²	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Drong et al. (2016)	CRINA	1 ¹	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Zhan et al. (2017)	Flavonoides	20 60 100 ²	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈ ≈	≈	≈	≈
Silva et al. (2018)	CRINA	44 ³	≈	≈	≈	≈	≈	↑	-	↑	↑	-
Kolling et al. (2018)	Extractos de orégano	0,056 ⁴	≈	≈	≈	≈	≈	≈	-	-	-	-
Kolling et al. (2018)	Extractos de té verde	0,028 ⁴	≈	≈	≈	≈	≈	≈	-	-	-	-
Kolling et al. (2018)	Orégano y té verde	0,056 ⁴	≈	≈	≈	↓	≈	↑	-	-	-	-
Chapman et al. (2019)	C	0 2 4 ⁵	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈
Elcoso et al. (2019)	E, acetato de geranilo, cilantro	200 ²	≈	-	-	≈	↓	↑	≈	≈	≈	≈
Silva et al. (2020)	Capsaicina, carvacrol, C, E	150 ³	≈	-	≈	↓	↑	≈	-	-	-	≈
Kholif et al. (2021)	Derivados de menta	3 6 ¹	↑	↓↓↓	↑↓	↑ ≈	↑↓	↓↑	-	-	-	-
Silvestre et al. (2023)	Acetato de geranilo, E	1 ¹	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	-

Nota. NH3, nitrógeno amoniacal; AGV, ácidos grasos volátiles totales; C2, ácido acético; C3, ácido propiónico; C4, ácido butírico; C5, valérico; ISOC4, isobutírico; ISOC5, isovalérico; PROTOZOA, población de protozoarios; C, cinamaldehído; E, eugenol; CRINA, timol, eugenol, vanillin y limoneno; ¹g/d; ²mg/d; ³mg/kg MS; ⁴% MS; ⁵mg/kg PV.

La tabla 4 muestra la respuesta de la fermentación ruminal al agregado de fitoquímicos en ganado lechero. El impacto de la utilización de fitoquímicos sobre la producción de AGV totales ha sido variable, evidenciando desde respuestas insignificantes hasta efectos tanto positivos como negativos (Kholif y Olafadehan, 2021). Otros estudios han demostrado la capacidad de ciertos fitoquímicos para reducir la concentración de NH_4 , influyendo principalmente en la reducción de protozoos (Bodas et al., 2012) o en la reducción de la producción de CH_4 , generado por una inhibición de las arqueas metanogénicas o supresión de los procesos metabólicos implicados en metanogénesis (Kholif y Olafadehan, 2021).

En este contexto, se han utilizado diferentes principios activos; la suplementación con polifenoles ha modificado la fermentación ruminal, principalmente a través de una mayor producción de AGV totales (AGVt) y menores emisiones de CH_4 en diferentes trabajos (Patra y Saxena, 2011). El uso de cinamaldehído ha aumentado la eficiencia de la producción, especialmente gracias a un menor CMS (Cantet et al., 2023). El uso de curcuminoides ha logrado mejorar la producción junto a un mejor estatus antioxidante en los animales (Molosse et al., 2019), mientras que el uso de piperina ha aumentado la productividad y eficiencia en las vacas lecheras (Silva et al., 2020). Por lo tanto, la combinación de estos fitoquímicos podría promover sinérgicamente una mayor producción con impactos positivos en la salud.

2. Hipótesis y objetivos del trabajo

2.1 Hipótesis

La adición de una mezcla de fitoquímicos a base de plantas o de monensina, en la dieta de las vacas lecheras en sistemas mixtos presenta la misma respuesta en términos de desempeño y utilización de nutrientes en el rumen.

2.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de la utilización de fitoquímicos o monensina sobre el desempeño productivo, los parámetros de fermentación ruminal y la población de protozoarios en vacas lecheras durante el período de transición y lactancia temprana en sistemas pastoriles mixtos.

2.3 Objetivos específicos

- I. Evaluar el efecto de aditivos (fitoquímicos y monensina) sobre el consumo de alimento, condición corporal, producción y composición de leche de vacas lecheras en transición.
- II. Evaluar el efecto de la inclusión de aditivos (monensina y fitoquímicos) sobre los parámetros ruminales (pH, AGV, NH₄) y población de protozoarios.

3. Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en la Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía (Paysandú, Uruguay, 32° S, 58° W) de la Universidad de la República (Udelar) desde febrero a junio del año 2022. El uso y procedimientos con animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (número de expediente: 020300-000055-22).

3.1 Diseño experimental y tratamientos

Se utilizaron sesenta vacas Holstein (24 primíparas y 36 multíparas). Al comienzo del experimento, el peso vivo (PV) de las vacas fue de 581 ± 14 kg y 655 ± 12 kg en primíparas y multíparas, respectivamente. El PV de los animales se evaluó de manera mensual después del ordeño de la mañana sin ayuno previo. La puntuación de condición corporal (CC) se evaluó semanalmente hasta los sesenta días posparto en una escala de cinco puntos (Edmonson et al., 1989) siendo de $3,36 \pm 0,27$ en las primíparas y $3,24 \pm 0,31$ en las multíparas al inicio del experimento. Las vacas fueron asignadas a un diseño completamente al azar restringido según paridad y fecha de parto esperada. Nueve vacas primíparas fueron fistuladas (y provistas de cánulas ruminales (Kehl® Indústria e Comércio LTDA, ME, Brasil) seis meses antes del parto con el objetivo de tener tres vacas fistuladas por tratamiento. Finalmente, 51 vacas completaron el estudio.

Se evaluaron tres grupos experimentales que consistieron en el agregado de 50 g/vaca/día de una asociación de fitoquímicos derivados de plantas (PHY), 0,300 g/vaca/día de monensina sódica (MON) y un grupo control sin aditivos (CTL), en una DTM desde los treinta días antes del parto hasta sesenta días posparto. La dosis final consumida por los animales fue de 45,7 g/d y 0,27 g/d de PHY y MON, respectivamente. Las vacas preparto fueron alimentadas con una DTM que contenía la premezcla de minerales y

los aditivos correspondientes a cada tratamiento. La oferta de DTM fue ajustada según los requerimientos y se suministró para que los animales tengan alimento la mayor parte del día.

Los datos reportados son de 16 vacas grupo CTL (nueve multíparas y siete primíparas), 16 vacas grupo MON (diez multíparas y seis primíparas) y 19 vacas del grupo PHY (doce multíparas y 7 primíparas).

Tabla 5

Ingredientes y composición química de la dieta totalmente mezclada.

<i>Ingredientes (% MS)</i>	<i>Preparto</i>	<i>Posparto</i>
Ensilaje de maíz	38,7	30,8
Paja de cebada	31,4	-
Heno de alfalfa	-	13,7
Harina de soja	16,2	13,7
Grano de maíz	4,36	27,4
Afrechillo de trigo	4,42	-
Grano de cebada	-	7,75
Carbonato cálcico	1,35	1,70
Cloruro sodio	-	0,69
Bicarbonato de sodio	-	0,68
Oxido de magnesio	-	0,67
Fosfato monocálcico	-	0,67
Azufre flores	-	1,75
Semitín de trigo 25 %	-	1,75
¹ Suplemento vitamínico mineral	3,45	0,33
Composición química		
MO	90,6 ± 1,34	91,3 ± 0,44
PC	10,8 ± 1,48	12,8 ± 0,96
FDN	44,2 ± 2,51	26,8 ± 3,44
FDA	25,9 ± 1,02	14,0 ± 1,50
Energía digestible (Mcal/Kg de MS)	2,86 ± 0,01	3,07 ± 0,01
EN _L (Mcal/Kg de MS)	1,47 ± 0,01	1,67 ± 0,01

Nota. MO, materia orgánica; PC, proteína cruda; FDN, fibra detergente neutro; FDA, fibra detergente ácido; EN_L: energía neta de lactancia. ¹Suplemento vitamínico mineral en el preparto: -9831 meq/kg, 6 % Mg, 0,20 % K, 2 % Na, 16 % Cl, 10 % S, 10 % Ca, 250 mg/Kg Cu, 8,0 mg/Kg Se, 1200 mg/Kg Zn, 9 mg/Kg I, 2,4 mg/Kg Co, 210000 UI/Kg vitamina A, 90000 UI/Kg vitamina D, 2400 UI/Kg vitamina E. En el posparto: 20000 mg/Kg Zn, 4000 mg/Kg Cu, 120 mg/Kg Se, 160 mg/Kg I, 40 mg/Kg Co, 1.200.00 UI/Kg vitamina A, 240.000 UI/Kg vitamina D3, 8.400 UI/Kg vitamina E. EN_L de la DTM: 1,909 – (0,017 x FDA).

Durante el parto, las vacas fueron manejadas en un encierro de cama caliente (*compost barn*) que consistía en un galpón techado, con ventilación (natural y forzada) y aspersores para enfriar los animales. Se alojaron los animales en corrales (cuatro vacas/corral), separadas en multíparas y primíparas, con un área de cama de compost de 54 m² (13,5 m²/animal). El área de alimentación adyacente era de 27 m² de concreto con un comedero de cuatro metros de longitud compartido por los cuatro animales. Cada corral tenía agua fresca a voluntad. Los materiales utilizados en la cama de compost fueron aserrín de eucalipto y pino, virutas de madera y cáscara de arroz, removidos con un cincel dos veces al día.

Después del parto y durante los primeros sesenta días de lactancia, las vacas tuvieron un turno de pastoreo de 7:00 a 14:00 horas. Fuera de este horario, las vacas eran separadas por categoría y tratamiento. Luego del ordeño de la tarde se suplementaban en el galpón con una DTM formulada para producir 36 L en multíparas, estimando un consumo de pastura de 10 kg de materia seca (MS). La DTM contenía la premezcla de minerales y los tratamientos (PHY o MON). En el caso de las primíparas se ofreció el 85 % de la DTM.

A lo largo del experimento, las vacas pastorearon alfalfa (*Medicago sativa*; 45 % del tiempo), festuca (*Lolium arundinacea*; 24 % del tiempo), achicoria (*Cichorium intybus*; 15 % del tiempo) o avena (*Avena sativa*; 15 % del tiempo). Durante el pastoreo, los tres grupos experimentales fueron manejados de manera independiente, con una asignación forrajera objetivo de 30 kg de MS medida a ras del suelo para permitirles maximizar el consumo de pastura.

Tabla 6

Composición química de la pastura seleccionada por las vacas de los grupos control (CTL), monensina (MON) y fitoquímicos (PHY) en los primeros sesenta días de lactancia (media $\pm$ SD).

Ítem	Pastura				
	<i>Festuca</i>	<i>Alfalfa</i>	<i>Achicoria</i>	<i>Alfalfa 2</i>	<i>Avena</i>
Disponibilidad	2921,2 $\pm$ 721	2091,6 $\pm$ 82	2936,1 $\pm$ 826,1	2069,5 $\pm$ 960,8	1764,0 $\pm$ 100,4
Prepastoreo	15,0 $\pm$ 1,28	29 $\pm$ 4,5	22 $\pm$ 0,56	20 $\pm$ 3,10	22 $\pm$ 4,5
Pospastoreo	13,9 $\pm$ 1,3	18,3 $\pm$ 4,2	18,6 $\pm$ 4,5	15,0 $\pm$ 3,4	15,2 $\pm$ 0,6
MS	27,0 $\pm$ 3,8	27,4 $\pm$ 2,5	13,8 $\pm$ 1,9	26,2 $\pm$ 1,7	22,6 $\pm$ 2,2
MO	88,3 $\pm$ 0,8	90 $\pm$ 0,2	84,6 $\pm$ 0,7	89,7 $\pm$ 0,7	88,1 $\pm$ 0,2
PC	17,3 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 1,3	18,3 $\pm$ 0,9	17,3 $\pm$ 2,6	16,5 $\pm$ 0,4
FDN	45,4 $\pm$ 1,1	41,6 $\pm$ 3,9	27,4 $\pm$ 3,1	34,1 $\pm$ 4,2	35,5 $\pm$ 1,0
FDA	25,4 $\pm$ 0,2	24,3 $\pm$ 1,3	18,6 $\pm$ 01,7	22,0 $\pm$ 2,3	21,7 $\pm$ 0,8

Nota. Disponibilidad, kg MS; Pre- y pospastoreo, cm; MS, materia seca (%); MO, materia orgánica (%); PC, proteína cruda (%); FDN, fibra detergente neutro (%); FDA, fibra detergente ácido (%); alfalfa, primer período de pastoreo; alfalfa 2, segundo período de pastoreo

Para determinar los tamaños adecuados de la parcela, se calculó semanalmente la disponibilidad de forraje utilizando la técnica de doble muestreo adaptada de Haydock y Shaw (1975). Cada semana se realizaba una recorrida de las áreas a ser pastoreadas, de las cuales se determinaban tres escalas según su altura de forraje, que corresponderían a una disponibilidad alta, media y baja de este; luego se tomaban tres muestras representativas de cada escala. La altura del pasto se midió utilizando un *sward stick* y las muestras se tomaron, cortando con tijeras, en un cuadrado de 30 x 30 cm a ras del suelo. El forraje cortado se pesó para obtener la materia fresca de la muestra, luego se llevó a estufa y se volvió a pesar, con el fin de determinar el peso de forraje en base seca para obtener el contenido de MS, que luego sería utilizado para lograr una regresión lineal relacionada con la disponibilidad forrajera (Kg MS/ha). El mismo procedimiento se utilizó para determinar la disponibilidad al final de la semana de pastoreo, buscando un mejor control de este y, además, evaluar que el CMS de pastura no estuviera limitado. La disponibilidad de la pastura fue desde $1764 \pm 100,4$ a $2936 \pm 826,1$ durante el experimento. La altura de la pastura fue desde $15 \pm 1,28$ a $29 \pm 4,5$ (tabla 6). El promedio de asignación forrajera para las vacas fue de $28 \pm 4,71$ kg MS/vaca/día.

3.2 Muestreo y análisis químico de alimentos

La DTM ofrecida se muestreó de manera semanal tomando una submuestra de cada comedero inmediatamente después de suministrado el alimento para componer una muestra representativa de cada tratamiento. El rechazo de alimento también se muestreó cada semana para medir el contenido de MS y utilizar este dato para estimar el CMS. Las muestras fueron analizadas semanalmente; luego, se realizó el promedio de todo el período.

La pastura seleccionada por las vacas fue muestreada utilizando la técnica *hand clipping*, adaptada de Coates y Penning (2000). Durante la primera sesión de pastoreo, se siguieron tres vacas por tratamiento en tres días específicos de la semana del potrero (días 1, 3 y 6). Las muestras se compusieron por semana y, finalmente, por período. Todas las muestras se

secaron a 60 °C en un horno de aire forzado hasta alcanzar un peso constante y se molieron a través de un molino Wiley (Thomas Scientific, EE. UU.), utilizando una malla de 1 mm para el análisis químico. Se determinaron los contenidos de MS (MS, AOAC 967,03), cenizas (CEN; AOAC 942,05), extracto etéreo (EE; AOAC 920,39), y nitrógeno (N; AOAC 984,13), según el procedimiento de la AOAC (1990). La MO se calculó como el resultado de la MS menos las cenizas. La proteína cruda (PC) se calculó como $N \times 6,25$. La fibra detergente neutro (FDN) se determinó sin sulfito de sodio y con alfa-amilasa resistente al calor y se expresó como libre de cenizas; la fibra detergente ácido (FDA) también se expresó libre de cenizas. Todas las fibras se determinaron según Van Soest et al. (1991), utilizando un analizador de fibras ANKOM 200® (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, EE. UU.). Los datos de composición química de la DTM ofrecida en el período preparto y posparto se muestran en la tabla 5. La composición química de los diferentes forrajes ofrecidos durante el posparto se muestra en la tabla 6.

3.3 Consumo

El CMS de la DTM se calculó como la diferencia entre la cantidad ofrecida y la cantidad de alimento rechazado o desperdiciado. Durante el período preparto, el CMS se midió diariamente por corral, mientras que en el período posparto se midió semanalmente para cada tratamiento y categoría. El CMS de pasto (kg de MS/vaca) se estimó a los 30 y 60 DEL mediante el balance de energía. Las estimaciones individuales del consumo de energía neta de lactación (ENL) se calcularon con base en los requerimientos de las vacas, utilizando las ecuaciones de la Academia Nacional de Ciencia, Ingeniería y Medicina (NASEM, 2021; Committee on Nutrient Requirements of Dairy Cattle et al., 2021) para el ganado lechero. El CMS de pasto se estimó como los kilogramos de pasto necesarios para proporcionar la energía restante para satisfacer los requerimientos de ENL de las vacas que no provenían de la DTM. La ENL proporcionada por la pastura y la DTM se calculó según lo describe Méndez et al. (2023) utilizando para la ENL de la pastura $(\text{Mcal/kg}) = 2,149 - (0,0223 \times \text{FDA})$ y la ENL de la DTM $(\text{Mcal/kg}) =$

1,909 – (0,017 × FDA). Los requerimientos de ENL de las vacas se estimaron como la suma de requerimientos para mantenimiento, actividad y requerimientos de producción de leche tomando en cuenta la energía aportada o requerida por la vaca para los cambios de PV y la CC. El requerimiento de energía neta (EN) para mantenimiento se estimó utilizando la ecuación de 0,10 Mcal de EN/ Kg PV^{0,75}; el requerimiento de lactancia se determinó utilizando la producción individual de leche y su composición y se consideraron los cambios de energía retenida en los tejidos de proteínas y grasas, medidos como PV y CC (NASEM, 2021).

3.4 Producción y composición de leche

Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día, a las 4:00 y las 16:00 horas. Las instalaciones del tambo cuentan con dieciséis plazas de ordeño dispuestas en un patrón de espina de pescado y se encuentran adyacentes al galpón de cama caliente. La producción individual de leche se registró diariamente utilizando medidores automáticos, sincronizados con el software DairyPlan® (GEA Farm Technologies, Düsseldorf, Alemania). El análisis de la composición de la leche, incluyendo el contenido de grasa, proteína, lactosa y urea, se determinó una vez por semana mediante espectrofotometría infrarroja (MilkoScan FossElectric FT2®, Drachten, Países Bajos). La composición diaria de leche se corrigió en función de la proporción de la producción de leche en los ordeños de la mañana y la tarde, ponderando según los kg de leche producidos en cada turno y su composición (concentración de grasa, proteína o lactosa). Los sólidos totales en leche (ST) se calcularon sumando la producción de lactosa, proteína y grasa (kg/d). La eficiencia alimenticia fue determinada según la relación entre producción de leche (kg/d) y CMS (kg/d).

La secreción de ENL en leche (ESL) se calculó como

$$ENL \text{ (Mcal/d)} = [((0.0929 * \text{kg de grasa}) + (0.0547 * \text{kg de proteína}) + (0.0395 * \text{kg de lactosa}) * 100] \text{ (NASEM, 2021)}.$$

3.5 Fermentación ruminal

Se recolectaron muestras de líquido ruminal de nueve vacas fistuladas (tres primíparas por tratamiento), siete días antes del parto y treinta y sesenta días después del parto. En todos los períodos, las vacas pastorearon sobre pradera de alfalfa al menos diez días previos al muestreo. Las muestras se recolectaron utilizando un dispositivo de extracción manual equipado con un tubo de cribado en el extremo y fueron obtenidas de diferentes partes del rumen. La recolección de líquido ruminal se realizó durante dos días consecutivos, a las 0, 4, 8, 16 y 24 horas con respecto a la alimentación matutina (primera alimentación del día), para la determinación de pH, NH₄, concentración de AGV y población de protozoarios. Las muestras se preservaron según el método descrito por Mattiauda et al. (2013). Inmediatamente después de la recolección, se midió el pH ruminal, utilizando un medidor de pH portátil (Oakton®, Eutech Instruments, Malasia). Las muestras de AGV y NH₄ se centrifugaron a 10.000 rpm durante diez minutos a 4 °C y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. La concentración de AGV se determinó mediante cromatografía de gases con un cromatógrafo modelo 8860 de Agilent equipado con un inyector automático, detector FID y una columna HP-INNOWAX (0,53 µm*30 m); se utilizó nitrógeno como gas portador, y la temperatura del detector se estableció en 240 °C. La concentración de NH₄ se determinó mediante espectrofotometría según el método de Chaney y Marbach (1962). Para determinar la densidad de protozoos, se guardó una submuestra en una proporción de 1:1 con formalina (10 %) y se almacenó a 4 °C hasta el recuento, que se realizó utilizando una cámara de Neubauer de doble retícula (Neubauer mejorada, Marienfeld Superior, Alemania). La solución de observación se preparó mezclando 1 mL de muestra preservada con tres gotas de Lugol (5 %) y posteriormente se la diluyó en 9 mL de glicerol (30 %). La solución se dejó reposar durante quince minutos, según lo descrito por Cedrola et al. (2015) y D'Agosto y Carneiro (1999), antes de ser observada utilizando un microscopio óptico (Labomed CxL, EE. UU.) a una magnificación de 10x.

3.6 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa SAS (SAS OnDemand) mediante el procedimiento GLIMMIX. Para analizar la normalidad de los datos, se utilizó el procedimiento Proc Univariate (SAS). Los datos de CMS, CC, producción y composición de la leche se analizaron por separado según la paridad. El CMS preparto incluyó el tratamiento como efecto fijo y el grupo de animales anidado dentro del tratamiento como efecto aleatorio en el modelo; también se incluyó la oferta de alimento como covariable. El modelo fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + G_j(T_i) + \beta X_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = consumo

μ = media general

T_i = efecto del tratamiento

$G_j(T_i)$ = efecto aleatorio; animales anidado dentro del tratamiento

βX_{ij} = covariable, oferta de alimento

ε_{ij} = error experimental

Para el CMS posparto, el modelo incluyó el efecto del tratamiento, DEL (30 y 60) y sus interacciones como efectos fijos; el PV al parto se utilizó como covariable y los animales se consideraron efectos aleatorios. El modelo fue el siguiente:

$$\gamma_{ijk} = \mu + T_i + D_j + (T \times D)_{ij} + \beta X_{ijk} + A_k + \varepsilon_{ijk}$$

γ_{ijk} = consumo posparto

μ = media general

T_i = efecto fijo del tratamiento

D_j = días en leche (30 y 60)

$(T \times D)_{ij}$ = interacción entre tratamiento y días en leche

βX_{ijk} = covariable de peso vivo

A_k = vaca considerada como efecto aleatorio

ε_{ijk} = error experimental

El modelo estadístico para CC incluyó los efectos del tratamiento, semana y su interacción, utilizando la CC al inicio del experimento como covariable. El modelo fue el siguiente:

$$\gamma_{ijk} = \mu + T_i + W_j + (T \times W)_{ij} + \beta X_{ijk} + A_k + \varepsilon_{ijk}$$

γ_{ij} = condición corporal observada

μ = media general

T_i = efecto fijo del tratamiento

W_j = efecto fijo de la semana

$(T \times D)_{ij}$ = interacción entre tratamiento y semana

βX_{ijk} = covariable de condición corporal al inicio del experimento

A_k = efecto aleatorio del animal

ε_{ijk} = error experimental

La producción y la composición de la leche se analizaron utilizando el procedimiento GLIMMIX, incluyendo en el modelo estadístico, el tratamiento como efecto fijo y la vaca como efecto aleatorio, y el PV al parto para la producción de leche, DEL y DEL² se utilizaron como covariables. El modelo fue el siguiente:

$$\gamma_{ijk} = \mu + T_i + \beta_1 PV_{ijk} + \beta_2 DEL_{ijk} + \beta_3 DEL^2_{ijk} + A_k + \varepsilon_{ijk}$$

γ_{ijk} = condición corporal observada

μ = media general

T_i = efecto fijo del tratamiento

$\beta_1 PV_{ijk}$ = covariable de peso vivo al parto

$\beta_2 DEL_{ijk}$ = covariable de los días en leche

$\beta_3 DEL^2_{ijk}$ = covariable de los días en leche al cuadrado

A_k = efecto aleatorio del animal

ε_{ijk} = error experimental

El modelo para analizar los datos de fermentación ruminal (AGV, NH₄, pH y protozoos) se analizó por separado antes y después del parto. El modelo incluyó el tratamiento, la hora de muestreo para el preparto y la hora anidada en el período (en el posparto) como efectos fijos y sus interacciones, y las vacas se consideraron efectos aleatorios. El modelo fue el siguiente:

Antes del parto:

$$\gamma_{ijk} = \mu + T_i + H_j + (T \times H)_{ij} + A_k + \varepsilon_{ijk}$$

Después del parto:

$$\gamma_{ij\kappa} = \mu + T_i + P_j + H_{\kappa}(P_j) + (T \times P)_{ij} + (T \times H)(P)_{i\kappa j} + A_{\iota} + \varepsilon_{ij\kappa\iota}$$

γ = variable de fermentación ruminal observada

μ = media general

T_i = efecto fijo del tratamiento

H_j = efecto fijo de la hora de muestreo (preparto)

P_j = efecto fijo del periodo de muestreo (posparto)

$H_{\kappa}(P_j)$ = efecto fijo de la hora anidada en el período (posparto)

$(T \times H)_{ij}$ = interacción entre tratamiento y hora de muestreo (preparto)

$(T \times P)_{ij}$ = interacción entre tratamiento y período (posparto)

$(T \times H)(P)_{i\kappa j} =$

interacción entre tratamiento y hora anidada en el período (posparto)

A_k y A_{ι} = efecto aleatorio del animal

ε_{ij} = error experimental

Los análisis *post hoc* se llevaron a cabo mediante la prueba de Tukey-Kramer. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0,05$ y tendencia cuando $P \leq 0,10$. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM (error estándar de la media).

4. Resultados

4.1 Consumo y condición corporal

Las vacas primíparas del grupo MON tuvieron un menor CMS (como porcentaje del PV) durante el período preparto en comparación con las vacas de los grupos PHY ($P = 0,03$) y CTL ($P < 0,01$) ($1,88 \pm 0,02\%$ PV vs. $1,98$ y $2,06 \pm 0,03 \%$, respectivamente). La suplementación con aditivos no afectó el CMS en las vacas multíparas durante el período preparto ($2,21$, $2,17$, $2,14 \pm 0,07 \%$ PV CTL, MON y PHY, respectivamente; $P = 0,574$). El CMS posparto no difirió entre tratamientos en ambas categorías ni hubo interacción entre el tratamiento y los DEL. El CMS en las vacas multíparas fue de $3,83 \pm 0,10 \%$, mientras que en las vacas primíparas fue de $3,68 \pm 0,10 \%$. El CMS aumentó ($P < 0,01$) en el período sesenta respecto al treinta en multíparas ($3,99$ vs. $3,70 \%$, respectivamente) y primíparas ($3,87$ vs. $3,48 \%$, respectivamente).

En multíparas, la CC no se vio afectada por los tratamientos, mientras que, en primíparas, la CC tendió ($P = 0,10$) a ser mayor en las vacas suplementadas con MON respecto al grupo CTL y el grupo PHY fue intermedio. La CC fue afectada por la semana ($P < 0,01$), debido a una disminución de esta durante el posparto (tabla 7).

Tabla 7

Condición corporal (CC) en vacas multíparas (M) y primíparas (P) sin suplementación de aditivos (CTL) o suplementadas con monensina (MON) o fitoquímicos (PHY).

Ítem	Tratamiento					P-valor		
	CTL	MON	PHY	EE	T	Semana	T*Semana	CCi
CC (P)	3,09	3,21	3,13	0,04	0,10	<0,01	0,29	0,05
CC (M)	3,01	2,98	3,00	0,03	0,97	<0,01	0,58	0,26

Nota. CC (P), condición corporal primíparas; CC (M), condición corporal multíparas; CTL, control; MON, monensina; PHY, fitoquímicos; EE, error estándar; T, tratamiento; CCi, condición corporal inicial.

4.1 Producción y composición de leche

El desempeño productivo es presentado en la tabla 8 para primíparas y en la tabla 9 para multíparas. El uso de aditivos en las vacas primíparas resultó en una mayor ($P = 0,01$) producción de leche en comparación con el grupo CTL. Además, hubo un aumento ($P = 0,04$) en la concentración de lactosa en la leche en PHY y MON (tabla 8).

Tabla 8

Producción y composición de leche en vacas primíparas sin suplementación de aditivos (CTL), suplementadas con monensina (MON) o fitoquímicos (PHY).

Ítem	Tratamiento					P-valor		
	CTL	MON	PHY	EE	T	PV	DEL	DEL ²
Producción								
Producción de leche (kg/d)	26,5b	28,5a	28,7a	0,52	0,01	0,01	<0,01	<0,01
ESL (Mcal/d)	19,5	210	20,2	0,86	0,50	0,47	0,21	0,41
Composición¹								
Grasa	3,71	3,73	3,59	0,15	0,53	0,49	<0,01	<0,01
Proteína	3,38	3,46	3,31	0,05	0,22	0,97	<0,01	<0,01
Lactosa	4,88b	5,00a	4,99a	0,05	0,04	0,55	<0,01	<0,01
Composición²								
Grasa	0,99	1,05	1,02	0,05	0,76	0,28	0,38	0,55
Proteína	0,91	0,98	0,94	0,03	0,35	0,45	0,30	0,52
Lactosa	1,30	1,43	1,42	0,04	0,11	0,49	<0,01	<0,01
ST (kg/d)	3,24	3,49	3,39	0,13	0,44	0,49	0,06	0,19
MUN (mg/dl)	14,2	14,5	13,0	0,99	0,54	0,69	0,14	0,29

Nota. CTL, control; MON, monensina; PHY, fitoquímicos; EE, error estándar; T, tratamiento; PV, peso vivo; DEL, días en leche; ESL: energía secretada en leche; composición¹, expresado en %; composición², expresado en kg/d; ST, sólidos totales; MUN, nitrógeno ureico en leche.

Por otro lado, en las vacas multíparas, los tratamientos no presentaron efectos en la composición de la leche, la ESL y la producción de ST. No obstante, la producción de leche tendió ($P = 0,07$) a ser mayor en el grupo MON en comparación con el grupo PHY, mientras que el grupo de CTL tuvo un valor intermedio (tabla 9). La urea en leche (MUN) tendió a ser mayor ($P =$

0,08) en las vacas del grupo MON en comparación con el grupo CTL y tuvo un valor intermedio en PHY.

Tabla 9

Producción y composición de leche en vacas multíparas sin suplementación de aditivos (CTL), suplementadas con monensina (MON) o fitoquímicos (PHY).

<i>Ítem</i>	<i>Tratamiento</i>					<i>P-valor</i>		
	<i>CTL</i>	<i>MON</i>	<i>PHY</i>	<i>EE</i>	<i>T</i>	<i>PV</i>	<i>DEL</i>	<i>DEL</i> ²
Producción								
Producción de leche (kg/d)	36,9	37,7	36,0	0,48	0,07	<0,01	<0,01	<0,01
ESL (Mcal/d)	25,9	26,3	25,5	0,55	0,50	<0,01	0,18	0,26
Composición¹								
Grasa	3,68	3,54	3,44	0,09	0,19	0,61	<0,01	0,01
Proteína	3,41	3,31	3,33	0,04	0,29	0,78	<0,01	<0,01
Lactosa	4,83	4,88	4,88	0,03	0,56	0,93	<0,01	<0,01
Composición²								
Grasa	1,30	1,32	1,25	0,03	0,21	<0,01	0,52	0,50
Proteína	1,23	1,24	1,22	0,03	0,83	<0,01	0,23	0,36
Lactosa	1,73	1,84	1,78	0,04	0,25	0,01	<0,01	<0,01
ST (kg/d)	4,31	4,41	4,28	0,09	0,55	<0,01	0,04	0,10
MUN (mg/dl)	13,4	15,4	13,6	0,62	0,08	0,69	0,13	0,47

Nota. CTL, control; MON, monensina; PHY, fitoquímicos; EE, error estándar; T, tratamiento; PV, peso vivo; DEL, días en leche; composición¹, expresado en %; composición², expresado en kg/d; ESL, energía secretada en leche; ST, sólidos totales; MUN, nitrógeno ureico en leche.

4.2 Fermentación ruminal y protozoo

En la tabla 10 se presentan los parámetros de fermentación ruminal y población de protozoarios en las vacas sin suplementación de aditivos (CTL), suplementadas monensina (MON) o fitoquímicos (PHY), previo al parto. En esta se observa que, previo al parto, no existió efecto de los aditivos sobre el pH ruminal, los AGVt, el perfil de AGV (C2, C3 y C4), en la relación C2:C3, ni en la concentración de NH₄. Sin embargo, el grupo PHY presentó numéricamente un menor contenido de NH₄ ruminal (P = 0,14).

Tabla 10

Parámetros de fermentación ruminal y población de protozoarios en las vacas sin suplementación de aditivos (CTL), suplementadas monensina (MON) o fitoquímicos (PHY), previo al parto.

Parámetros ruminales	Tratamiento					P-valor	
	CTL	MON	PHY	EE	T	Hora	T*Hora
pH ruminal	6,50	6,53	6,66	0,06	0,18	<0,01	0,83
Amonio	101,01	101,16	77,30	9,70	0,14	0,20	0,36
AGV totales	91,47	94,80	103,17	7,95	0,57	0,33	0,99
Acetato (%)	62,94	64,66	61,14	1,56	0,24	0,12	0,96
Propionato (%)	23,23	23,15	22,16	0,89	0,63	0,40	0,77
Butirato (%)	11,11	11,01	11,63	0,97	0,88	0,07	0,98
Valerato (%)	1,18a	0,96b	1,16ab	0,07	0,05	0,02	0,99
AGVr (%)	1,22b	1,30ab	1,78a	0,15	0,04	0,10	0,99
C2:C3	2,72	2,91	2,73	0,16	0,64	0,32	0,99
(C2 + C4) /C3	3,22	3,26	3,48	0,17	0,55	0,46	0,90
Protozoarios	12,28a	6,72b	8,23ab	1,35	0,01	0,01	0,88

Nota. CTL, control; MON, monensina; PHY, fitoquímicos, EE, error estándar; T, tratamiento; Amonio, expresado en ppm; AGV totales, expresados en mmol/L; AGVr, AGV ramificados; C2:C3, relación acético: propiónico; (C2+C4) /C3, relación Cetogénicos: glucogénicos; Protozoarios, población expresada en cel/ml x10⁴.

El porcentaje de AGV ramificados (AGVr; isovalerato e isobutirato) fue mayor en las vacas del grupo PHY en comparación con las vacas CTL ($P = 0,03$), mientras que MON fue intermedio. La suplementación con MON disminuyó las concentraciones de valerato respecto al grupo CTL ($P = 0,05$). La hora de muestreo afectó al pH ruminal y el valerato. No se observó interacción entre el tratamiento y la hora de muestreo para ninguno de los parámetros durante el período previo al parto. El número de protozoos fue menor ($P < 0,01$) en las vacas MON y tendió a ser menor ($P = 0,09$) en las vacas PHY en comparación al CTL. La hora de muestreo también afectó el número de protozoos, pero no se encontró interacción entre este y el tratamiento.

Tabla 11

Parámetros de fermentación ruminal y población de protozoarios en las vacas sin aditivos (CTL), suplementadas con monensina (MON) o fitoquímicos (PHY), después del parto (treinta y sesenta días posparto).

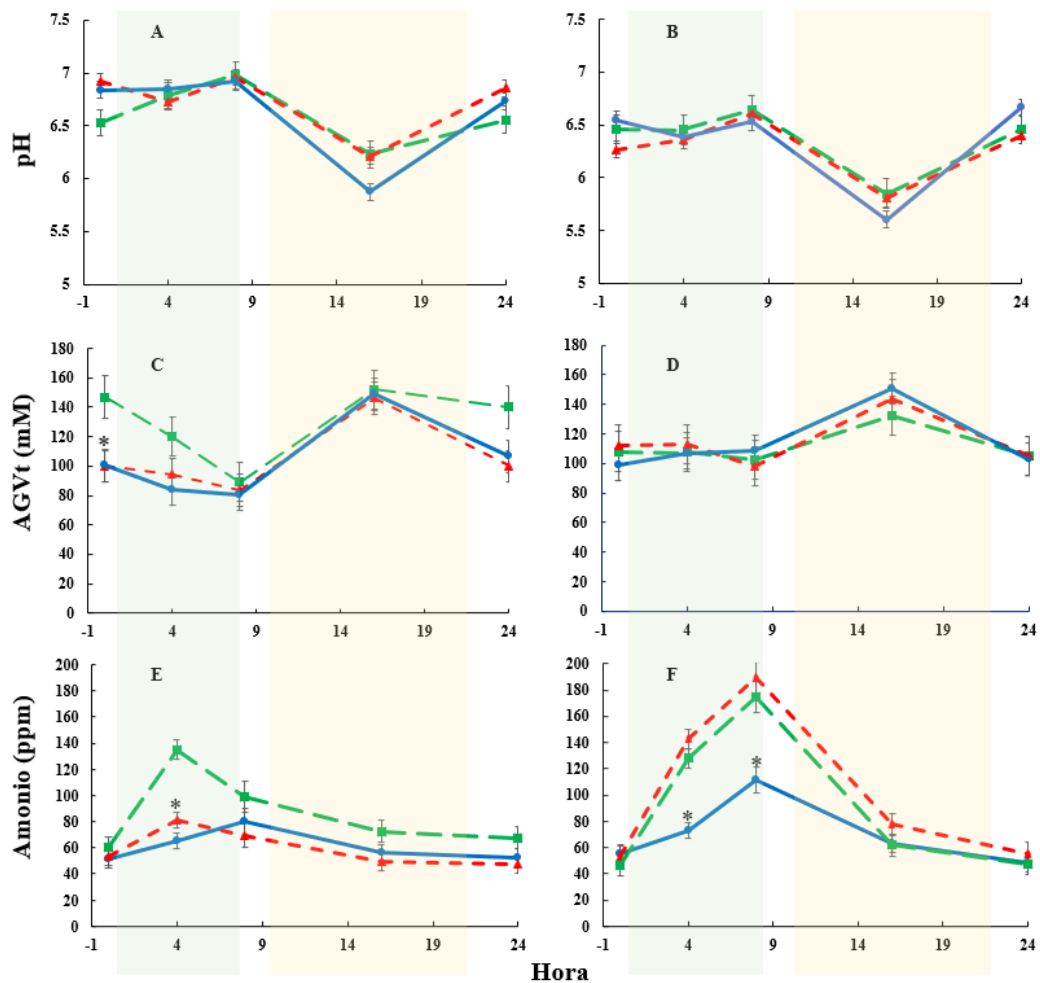
Parámetros ruminales	Tratamiento					P-valor			
	CTL	MON	PHY	EE	T	Hora	Per	T* Per	T* Hora
pH ruminal	6,50	6,51	6,50	0,03	0,90	<0,01	<0,01	0,04	0,01
Amonio	89,35a	82,01a	65,75b	2,59	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
AGV totales	120,46	109,73	108,90	3,85	0,09	<0,01	0,95	0,02	0,91
Acético (%)	60,98	61,08	60,86	0,54	0,96	<0,01	0,70	0,01	0,99
Propiónico (%)	24,30	25,24	26,11	0,55	0,08	0,20	0,14	0,02	0,99
Butírico (%)	12,32a	11,61a	10,50b	0,28	0,01	<0,01	0,01	0,50	0,61
Valerato (%)	1,56a	1,18b	1,42a	0,07	0,01	0,24	0,14	0,05	0,69
AGVr (%)	1,15a	0,93b	0,93b	0,04	0,01	<0,01	0,06	0,36	0,93
C2:C3	2,57	2,45	2,38	0,07	0,24	0,04	0,48	0,02	0,99
(C2 + C4) / C3	3,07	2,91	2,78	0,09	0,09	0,40	0,61	0,03	0,98
Protozoarios	11,55a	7,12b	4,03b	1,10	<0,01	0,62	0,02	0,17	0,99

Nota. CTL, control; MON, monensina; PHY, fitoquímicos, EE, error estándar; T, tratamiento; amonio, expresado en ppm; AGV totales, expresados en mmol/L; AGVr, AGV ramificados; C2:C3, relación acético:propiónico; (C2 + C4) / C3, relación cetogénicos:glucogénicos; protozoarios, población expresada en cel/ml x10⁴.

Durante el posparto, no hubo efecto del tratamiento en el pH ruminal; sin embargo, el período de muestreo, la hora y las interacciones tratamiento por período y tratamiento por hora de muestreo fueron significativos. Los valores de pH fueron mayores ($P < 0,01$) a los treinta días que a los sesenta días posparto (6,67 vs. 6,34, respectivamente). En ambos períodos (treinta y sesenta días posparto), el pH se mantuvo estable en todos los tratamientos durante las primeras ocho horas, cuando las vacas estaban pastoreando (figura 3). El pH ruminal disminuyó a la hora 16 luego del ingreso al pastoreo (figura 3A, B). A los treinta días posparto, en las vacas suplementadas con aditivos, la hora 16 fue significativamente menor ($P = 0,01$) que las demás horas, mientras que, en el grupo CTL, la hora 16 fue diferente solamente de las horas 4 y 8 (figura 3A). A los sesenta días posparto, el pH ruminal a las 16 horas fue diferente de todas las demás horas en las vacas PHY y CTL, mientras que en las vacas MON no fue diferente de la hora 0 (figura 3B).

Figura 3

pH ruminal (A, B), ácidos grasos volátiles totales (AGVt; C, D) y amonio (E, F) para el grupo control (verde), monensina (rojo) y fitoquímicos (azul) a los treinta días posparto (A, C, E) y sesenta días posparto (B, D, F) para cada tiempo de medición (eje X, la hora 0 corresponde a la primera alimentación del día). El área sombreada con verde corresponde al tiempo que los animales se encontraban en la pastura, el área sombreada en amarillo corresponde al tiempo que los animales se encontraban dentro del galpón de cama caliente.



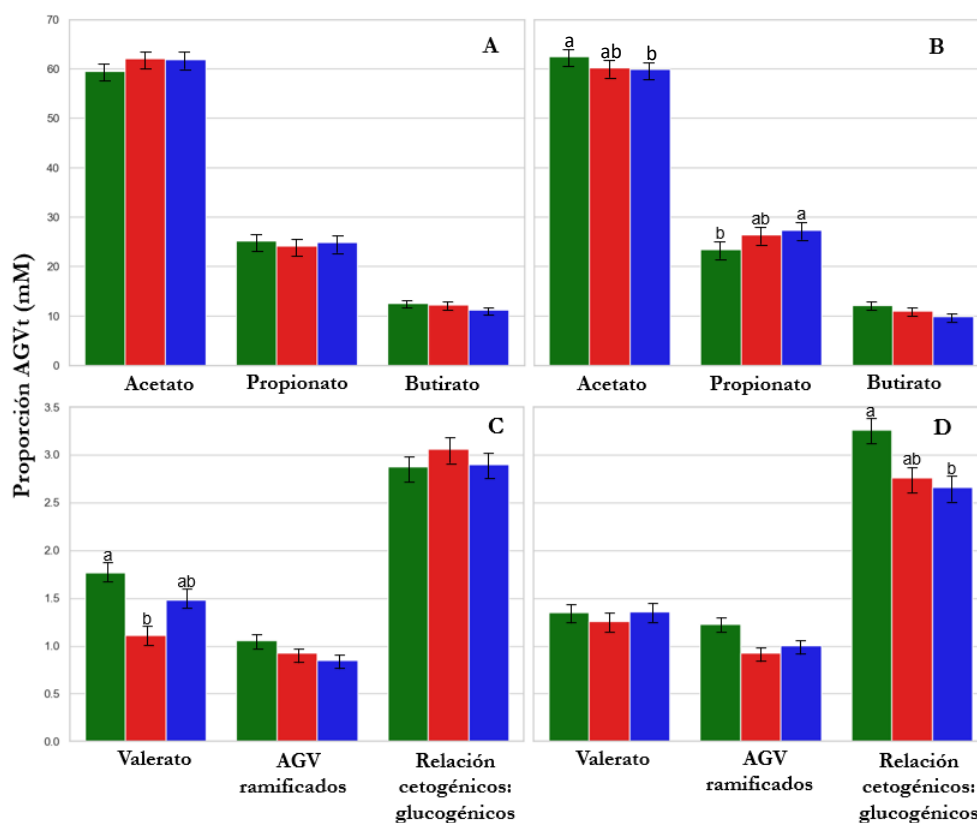
Los AGVt fueron afectados por la hora y la interacción entre tratamiento y período. Las vacas CTL tendieron a presentar valores mayores ($P < 0,05$) que las vacas PHY y MON a los treinta días posparto (tabla 11), mientras que a los sesenta días los AGVt fueron similares entre grupos. En las vacas CTL se observó una disminución de los AGVt de 0 a 8 horas, mientras que se mantuvo estable en las vacas PHY y MON durante este período. Los niveles

máximos de concentración de AGVt se observaron a las 16 horas en todos los grupos (figura 3C). A los sesenta días posparto, todos los tratamientos mostraron patrones similares (figura 3D).

En cuanto a la composición de los AGV, se observó una interacción entre el tratamiento y el periodo para el C2, no observamos cambios durante el período treinta entre los tres grupos, mientras que en el periodo sesenta, el C2 fue mayor ($P = 0,02$) en las vacas del grupo CTL en comparación con las vacas suplementadas con PHY (Figura 4A, B). Se observó una interacción entre tratamiento y período para el C3, este no fue diferente durante el período treinta entre los tres grupos, mientras que en el período sesenta fue mayor ($P = 0,01$) en las vacas PHY en comparación con las vacas CTL (figura 4A, B). La proporción de C4 fue menor ($P < 0,01$) en el tratamiento PHY respecto al grupo CTL (tabla 11; figura 4B), mientras que los AGVr fueron menores ($P = 0,01$) en las vacas suplementadas con aditivos en comparación con el grupo CTL (tabla 11).

Figura 4

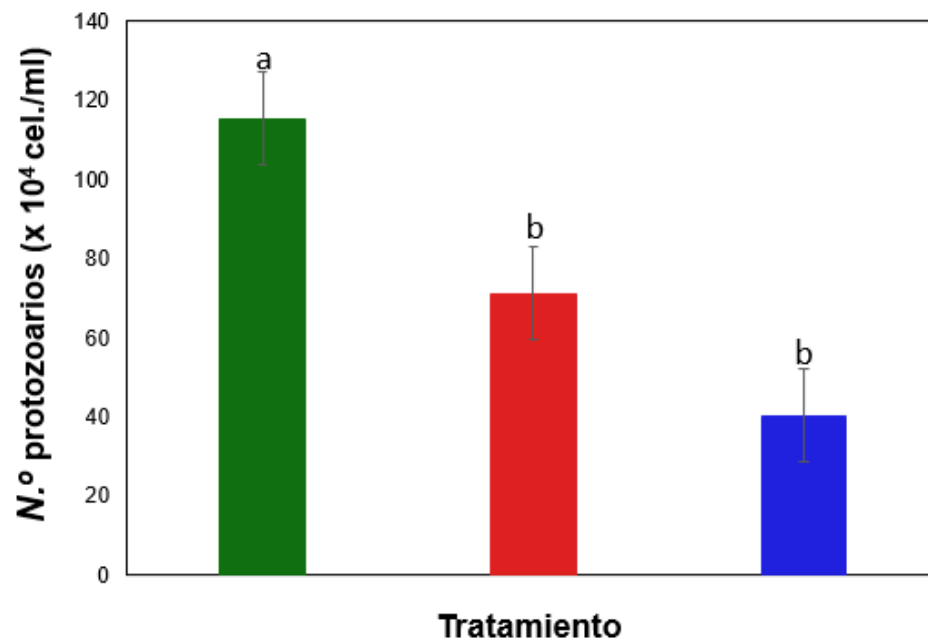
Proporción de ácidos grasos volátiles respecto a los ácidos grasos volátiles totales (AGVt) y relación cetogénicos:glucogénicos (acético+butírico: propiónico) para los tratamientos control (verde), monensina (rojo) y fitoquímicos (azul), a los treinta (A, C) y sesenta días posparto (B, D).



La relación C2:C3 no se vio afectada por el tratamiento; sin embargo, fue afectada la interacción tratamiento-período ($P = 0,02$). Esta no fue diferente a los treinta días entre los grupos, pero fue mayor ($P = 0,04$) en el grupo CTL respecto a PHY a los sesenta días posparto (2,72 vs. $2,27 \pm 0,10$), mientras que MON fue intermedio. La relación de precursores cetogénicos:glucogénicos ($C2 + C4:C3$) fue afectada por la interacción tratamiento-período; esta no fue diferente entre tratamientos a los treinta días, mientras que fue menor ($P = 0,02$) en las vacas suplementadas con PHY a los sesenta días (figura 4C, D).

Figura 5

Población de protozoarios en los tratamientos control (verde), monensina (rojo) y fitoquímicos (azul), durante el postparto.



La concentración de NH₄ ruminal fue afectada por el tratamiento, el período, la hora y sus interacciones (tabla 11, figura 3E, F). En general, las vacas PHY exhibieron menores ($P < 0,01$) concentraciones de NH₄ comparadas con las vacas CTL y MON. A los treinta días, la concentración de NH₄ fue similar en las vacas suplementadas con aditivos y menor ($P < 0,01$) respecto al grupo CTL, mientras que, a los sesenta días, PHY presentó menor ($P < 0,01$) concentración de NH₄ respecto a CTL y MON y estos últimos dos fueron similares. A los treinta días posparto, las vacas CTL presentaron mayor concentración de NH₄ en la hora 4 en comparación con la hora 0, 16 y 24, mientras que en las vacas suplementadas con aditivos no se observaron diferencias entre horas para este período. A los sesenta días, las vacas CTL y MON mostraron patrones similares, con valores de NH₄ mayores en las horas de medición 4 y 8 respecto a la hora 0, 16 y 24; estas diferencias entre diferentes hora de medición no fueron observadas en las vacas

suplementadas con PHY. La concentración de NH₄ fue mayor a los sesenta días que a los treinta días posparto (88,64 vs. 69,45 ppm, respectivamente).

A los treinta días posparto, las concentraciones de NH₄ en la hora 4 fueron más altas ($P = 0,01$) en el grupo CTL en comparación con MON y PHY (figura 3). Contrariamente, a los sesenta días posparto, las vacas PHY exhibieron menor concentración de NH₄ en las horas 4 y 8 comparados con el grupo CTL ($P = 0,01$; $P = 0,03$) y MON ($P < 0,01$; $P = 0,01$) (figura 3).

El número de protozoos fue afectado por el tratamiento; las vacas suplementadas con aditivos redujeron ($P < 0,01$) el número de protozoos en comparación con las vacas del grupo CTL y no se observaron diferencias entre grupo MON y PHY (tabla 11). El período también afectó el número de protozoos, siendo mayor a los sesenta días posparto que a los treinta días, pero no se encontraron interacciones entre el tratamiento y la hora de muestreo ni entre el tratamiento y el período (figura 5).

5. Discusión

Las variables productivas son acordes a la dieta prevista y a resultados observados en estudios anteriores realizados en la misma plataforma experimental y bajo condiciones similares (Fajardo et al., 2015; Jasinsky et al., 2019). Del mismo modo, las principales variables ruminales (pH, AGV, NH₄) se comportaron dentro de los rangos reportados tanto para vacas secas (Tassoul y Shaver, 2009) como para vacas lecheras en pastoreo con suplementación (Bargo et al., 2002, 2003).

Las vacas primíparas suplementadas con MON presentaron un menor CMS en el parto. El menor CMS con la suplementación de monensina se ha asociado con el efecto hipofágico de aumentar el aporte de propionato al hígado (Duffield et al., 2012), principalmente en etapas donde la demanda de glucosa no es alta (Oba y Allen, 2003). A pesar de esto, no observamos mayor concentración de C3 ruminal en las vacas suplementadas con MON durante el parto.

El CMS también es influenciado por factores como el llenado ruminal y los cambios en las tasas de digestibilidad del alimento (Varga et al., 1984). En un estudio paralelo, la suplementación con aditivos disminuyó la degradabilidad de la MO en la dieta parto (datos no publicados), lo que puede ser explicado por una menor concentración de protozoarios en rumen, dado el rol que tienen estos en la etapa inicial de colonización de los alimentos (Newbold et al., 2015). Aunque ambos aditivos disminuyeron los protozoarios y la degradación de la MO, PHY no presentó un menor CMS, lo que sugiere que otros factores pueden estar influyendo en la respuesta; por ejemplo, las características aromáticas de los fitoquímicos, que pueden estimular el consumo en vacas lecheras (Matloup et al., 2017). Esto es positivo dado que, en este período, un menor CMS es algo no deseado, siendo uno de los principales objetivos maximizar el CMS (Grummer, 1995).

La CC, utilizada como un indicador del balance energético de los animales, mostró mínimas variaciones entre tratamientos. Todas las vacas

ingresaron al parto con la CC adecuada para esta etapa (3,0-3,5; Roche et al., 2009). Durante el posparto temprano, todas las vacas movilizaron reservas corporales dentro de rangos normales (0,5 punto de CC; Roche et al., 2009). En primíparas la CC fue similar para todas las vacas durante las primeras semanas preparto, pero, cerca del parto y el posparto, las vacas suplementadas con MON mostraron una CC más alta en comparación con el grupo CTL, mientras que PHY fue intermedio. Las vacas primíparas suplementadas con MON podrían estar mejor preparadas para manejar el desafío de la lactancia. Duffield et al. (2008a) sugiere que la mejor CC en vacas suplementadas con MON está asociada a un mejor balance energético de los animales. Similares a nuestros resultados, Drong et al. (2016) observaron un mejor status energético durante la transición en vacas suplementadas con MON, pero no vio cambios en las vacas suplementadas con una mezcla de fitoquímicos compuesta principalmente por timol, eugenol, vainilla, guayacol, limoneno.

En las vacas primíparas suplementadas con aditivos, la producción de leche y la concentración de lactosa fueron mayores (+7,9 % y +2,4 %, respectivamente). La glucosa es el sustrato energético más importante, promueve el metabolismo y la producción de leche, especialmente en vacas en pastoreo, en las que podría actuar como limitante en la producción (McArt et al., 2013; Reynolds et al., 2003). Una mayor disponibilidad de glucosa puede atribuirse a un aumento en los precursores gluconeogénicos. El C3, lactato y aminoácidos han sido previamente reportados en vacas lecheras como principales precursores de glucosa durante el inicio de la lactancia (Larsen y Kristensen, 2013).

En este contexto, diferentes metaanálisis (Duffield et al., 2008b; Rezaei Ahvanooei et al., 2023) han observado un aumento en la producción de vacas suplementadas con monensina. Por otro lado, la combinación de PHY utilizada en nuestro trabajo no ha sido evaluada previamente. Sin embargo, los compuestos individuales —cinamaldehído, polifenoles, curcuminoides y piperina—, así como otras mezclas de fitoquímicos, han reportado efectos

positivos en el desempeño productivo y la salud de los animales (Elcoso et al., 2019; Silva et al., 2020; Wall et al., 2014).

La mejora en productividad con estos aditivos se ha asociado con cambios en la fermentación ruminal, atribuibles a la capacidad para aumentar la producción de C3, reducir la de C2 y C4 y disminuir las pérdidas de carbono en forma de CO₂ y CH₄ (Rezaei Ahvanooei et al., 2023; Silva et al., 2020). Además, algunos ensayos reportan una menor degradación proteica en el rumen, lo que podría incrementar el pasaje de aminoácidos al intestino y un mayor aporte de proteína y precursores de glucosa (Mezzetti et al., 2019; Rodrigues et al., 2019). También, los fitoquímicos han demostrado que pueden mejorar la capacidad antioxidante de los animales (Molosse et al., 2019). En nuestro trabajo, la mayor producción puede asociarse con los cambios observados en el rumen, principalmente una menor pérdida de energía y nutrientes en forma de CH₄ y NH₄, así como el mayor aporte de precursores para la síntesis de glucosa.

En vacas multíparas, no se observaron cambios en la producción ni en la composición de la leche. Se ha reportado una mayor concentración de MUN en vacas suplementadas con monensina (Mullins et al., 2012; Rezaei Ahvanooei et al., 2023), aunque la causa exacta no está claramente establecida. Se ha asociado a una mejor funcionalidad hepática, presumiblemente debido a una menor infiltración de triglicéridos, lo cual podría resultar en una mayor producción de urea. A su vez, se ha sugerido que esta mejora podría estar relacionada con una mayor digestión de aminoácidos en el intestino, posiblemente como resultado de una menor degradación proteica en el rumen (Duffield et al., 2008a).

La respuesta diferencial entre categorías puede estar influenciada por diversos factores. La dosis final administrada de ambos aditivos pudo diferir entre vacas multíparas y primíparas debido a la competencia propia de cada categoría, lo que puede afectar el resultado final de su suplementación (Khiaosa-ard y Zebeli, 2013; Rezaei Ahvanooei et al., 2023). Dosis mayores

pueden tener un efecto perjudicial en la fermentación ruminal, así como dosis menores podrían no lograr los cambios esperados.

Además, Wall et al. (2014) evaluaron diferentes dosis de fitoquímicos en dos experimentos distintos, donde las vacas primíparas y multíparas respondieron de manera diferente a dosis iguales. Por ejemplo, una dosis de 200 mg/d de cinamaldehído y eugenol aumentó la producción de leche en primíparas, pero no en multíparas. Por lo tanto, se sugiere que la dosis óptima de fitoquímicos puede depender de la categoría del animal.

La glucosa pudo haber sido una mayor limitante para la producción de leche en primíparas. Aunque generalmente durante la lactancia la glucosa no es un factor limitante debido al control de homeorresis de la glándula mamaria (Lemosquet et al., 2009), puede llegar a serlo en ciertas etapas, como en el período de transición y durante la activación del sistema inmune (Kvidera et al., 2017). En el período de transición, todas las vacas experimentan inflamación, pero esta es mayor en primíparas, lo que incrementa la demanda de glucosa por parte del sistema inmune y potencialmente limita la producción de leche (McCarthy et al., 2020). Un mayor aporte de precursores para la síntesis de glucosa podría tener un impacto más significativo en primíparas.

5.1 Fermentación ruminal

La respuesta a los aditivos fue diferente entre períodos (demostrando la interacción de estos con la dieta y la etapa fisiológica de las vacas). Durante el parto, la suplementación con aditivos generó una inhibición de los protozoarios en el rumen. El efecto de la monensina o fitoquímicos sobre los protozoarios ha sido variable. Algunos trabajos reportan efectos inhibitorios sobre los protozoarios (Benchaar et al., 2008; Newbold et al., 1997). Sin embargo, la determinación de protozoarios ruminales es una técnica con ciertas limitantes y, por ello, muchos estudios no los reportan o presentan resultados diversos (Firkins y Yu, 2015). El mecanismo de acción se ha asociado a la alteración de la permeabilidad de la membrana de estos microorganismos.

La suplementación con PHY durante el preparto generó una mayor concentración de AGVr en el rumen, los cuales se producen durante la degradación de proteínas (Firkins, 2021). La concentración de NH_4 en el rumen fue numéricamente menor. Esto sugiere que no hubo una mayor producción de estos AGVr, sino una menor utilización de AGVr en el tratamiento con PHY. Las bacterias ruminales, principalmente las celulolíticas, son las principales consumidoras de estos AGVr (Liu et al., 2020). Por lo tanto, durante el preparto puede haber ocurrido una menor actividad de estas bacterias en PHY, lo que podría ser responsable, en parte, de la menor degradabilidad de la MO observada (datos no publicados). En dietas de baja calidad, similares a las del preparto, Tomkins et al. (2015) observó un aumento de los AGVr con la suplementación de fitoquímicos en la recría de novillos.

La ausencia de efectos significativos en el preparto podría estar relacionada con la interacción entre los aditivos y la dieta. Benchaar et al. (2006) sugiere que los cambios en los AGV pueden depender de la fermentabilidad del almidón y de la relación forraje-concentrado en la dieta. Es así como la dieta preparto, caracterizada por su bajo contenido de almidón y alto contenido de forraje, pudo influir en la respuesta ruminal observada y explicar en parte las diferencias con el posparto.

En la primera medición posparto, el grupo CTL mostró una mayor concentración de AGVt, aunque esta diferencia no se mantuvo a medida que avanzaba la lactancia. Durante el inicio de la lactancia, la PDR de la dieta total fue menor, debido principalmente al menor CMS de pastura y a la baja concentración de PC en la DTM, que fue la principal fuente de alimento de los animales. Bajo estas condiciones, los protozoarios pueden ser beneficiosos al aumentar la degradación de proteínas y permitir maximizar la fermentación ruminal mediante el aporte de NH_4 para las bacterias celulolíticas (Williams y Coleman, 1992). De la misma manera, en dietas con baja PDR, los AGVr estimulan la degradación de la FDN y la fermentación bacteriana (Firkins y Mitchell, 2023). Por lo tanto, la menor concentración de NH_4 y AGVr en las

vacas con aditivos podría explicar la menor concentración de AGVt en el primer período de medición asociado a una menor fermentación ruminal.

La suplementación con monensina o fitoquímicos ha demostrado inhibir las bacterias HAP en el rumen, principales bacterias fermentadoras de aminoácidos y productoras de NH_4 (McIntosh et al., 2003). Además, trabajos previos (Benchaar et al., 2006, 2008; Bodas et al., 2012; Calsamiglia et al., 2007) han observado la reducción del número de protozoarios con la suplementación de estos aditivos. Estas condiciones (la reducción del número de protozoarios y bacterias HAP) contribuyen a disminuir la degradación de proteína en el rumen y a aumentar la síntesis de proteína microbiana, incrementando las proteínas de pasaje.

Los cambios mencionados se reflejan en los patrones de fermentación de NH_4 en rumen. Se observaron curvas más estables en las vacas PHY, las que permiten, además, una captación más eficiente del NH_4 por las bacterias y un menor gasto energético para su eliminación. Estos cambios (menor concentración de protozoarios y degradación proteica) posiblemente generaron un mayor aporte de proteína al intestino del animal, utilizado tanto para la síntesis de glucosa (como precursores glucogénicos) como para satisfacer la alta demanda proteica durante esta etapa (Larsen et al., 2015; Larsen y Kristensen, 2013).

A pesar de lo mencionado, las vacas suplementadas con monensina no evidenciaron menor concentración de NH_4 en los dos períodos de medición en posparto, lo que puede estar asociado a una adaptación de los microorganismos HAP a la monensina (Elcoso et al., 2019). Por lo tanto, otros cambios en el rumen podrían explicar la mayor producción de leche observada. A los sesenta días, ambos aditivos aumentaron (+13,0 % la proporción de C3) la fermentación propiónica en comparación con el grupo CTL. El C3 es el principal precursor de glucosa de la vaca lechera (Larsen y Kristensen, 2013) y su aumento se ha relacionado con una mayor captura de nutrientes para el hospedador y menores pérdidas energéticas en forma de CH_4 (Firkins, 2021).

Por otro lado, tanto la suplementación con MON como con PHY disminuyeron el número de protozoarios. La reducción de protozoarios se ha asociado con una menor producción de CH₄, debido al rol de estos en la transferencia de di hidrogeniones a las metanógenas (Newbold et al., 2015; Wang et al., 2023). Estos cambios podrían explicar cómo ambos aditivos mantuvieron una mayor producción de leche durante todo el período de medición en vacas primíparas.

La mayor producción de C₃ en rumen se ha relacionado con una inhibición de bacterias grampositivas (productoras principalmente de C₂, C₄ y NH₄) en favor de las bacterias gramnegativas (productoras de C₃; Benchaar et al., 2008; Rezaei Ahvanooei et al., 2023). Uno de los principales efectos reportados de la suplementación con monensina es el aumento de C₃, aunque este cambio no siempre es observable (tabla 2). De manera similar, la suplementación con fitoquímicos ha mostrado respuestas variables (tabla 4).

En el segundo período de medición, la concentración de AGVt fue similar entre grupos; a su vez, el CMS de pastura y las concentraciones de NH₄ ruminal fueron mayores, lo que puede explicar esta respuesta. Las diferencias entre períodos reafirman la variabilidad de las respuestas ruminales a la suplementación con aditivos, especialmente en un entorno con una gran variabilidad en la dieta de los animales.

Durante las mediciones ruminales, los animales se encontraban en una pradera de alfalfa, aunque en las parcelas se podían encontrar diferentes especies vegetales (malezas o, por ejemplo, lotus, trébol, etc.). Cada especie presenta su propia composición de fitoquímicos y se ha observado que las vacas tienen preferencias por estos, adaptando su consumo según sus necesidades y buscando una combinación que mejore su salud y producción (Villalba et al., 2004). Estas variables, que no se presentan en un sistema de confinamiento, deben tenerse en cuenta a la hora de evaluar estos aditivos en sistemas pastoriles.

6. Conclusiones

La suplementación con ambos aditivos aumentó la producción de leche en vacas primíparas, lo que demuestra que los fitoquímicos pueden ser una alternativa a la monensina. Los efectos de la monensina y los fitoquímicos sobre los parámetros ruminales y la población de protozoarios fueron similares respecto a la población de protozoarios. Además, ambos aditivos disminuyeron la concentración de NH_4 ruminal, aunque con una mayor estabilidad observada en el caso los fitoquímicos durante todo el período posparto. Se observó un aumento de precursores glucogénicos, particularmente en el segundo período de medición posparto, con la suplementación de PHY. Los fitoquímicos evidenciaron cambios más estables en los parámetros ruminales. Es necesario comprender mejor la interacción entre los aditivos, la población de microorganismos y el ambiente ruminal.

La suplementación con los aditivos evaluados puede considerarse una estrategia viable para modular la fermentación ruminal en vacas lecheras durante el período de transición e inicio de lactancia en sistemas pastoriles mixtos de Uruguay.

7. Bibliografía

- Ahmed Soltan, Y. y Kumar Patra, A. (2022). Ruminant Microbiome Manipulation to Improve Fermentation Efficiency in Ruminants. En A. Kumar Patra (ed.), *Veterinary Medicine and Science* (vol. 10). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101582>
- Akins, M. S., Perfield, K. L., Green, H. B., Bertics, S. J. y Shaver, R. D. (2014). Effect of monensin in lactating dairy cow diets at 2 starch concentrations. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 917–929. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6756>
- Bach, A., Elcoso, G., Escartín, M., Spengler, K. y Jouve, A. (2023). Modulation of milking performance, methane emissions, and rumen microbiome on dairy cows by dietary supplementation of a blend of essential oils. *Animal*, 17(6), 100825. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100825>
- Bargo, F., Muller, L. D., Kolver, E. S. y Delahoy, J. E. (2003). Invited Review: Production and Digestion of Supplemented Dairy Cows on Pasture. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 1–42. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73581-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73581-4)
- Bargo, F., Muller, L. D., Varga, G. A., Delahoy, J. E. y Cassidy, T. W. (2002). Ruminant Digestion and Fermentation of High-Producing Dairy Cows with Three Different Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Rations. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2964–2973. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74382-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74382-8)
- Beauchemin, K. A., Ungerfeld, E. M., Eckard, R. J. y Wang, M. (2020). Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*, 14, s2–s16. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>
- Benchaar, C. (2016). Diet supplementation with cinnamon oil, cinnamaldehyde, or monensin does not reduce enteric methane

- production of dairy cows. *Animal*, 10(3), 418–425.
<https://doi.org/10.1017/S175173111500230X>
- Benchaa, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A. y Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), 209–228.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>
- Benchaa, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Whyte, T. D. y Chouinard, P. Y. (2006). Effects of Addition of Essential Oils and Monensin Premix on Digestion, Ruminal Fermentation, Milk Production, and Milk Composition in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 89(11), 4352–4364. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72482-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72482-1)
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. J. y López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4), 78–93.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>
- Braun, H.-S., Schrapers, K. T., Mahlkow-Nerge, K., Stumpff, F. y Rosendahl, J. (2019). Dietary supplementation of essential oils in dairy cows: Evidence for stimulatory effects on nutrient absorption. *Animal*, 13(3), 518–523. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001696>
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L. y Ferret, A. (2007). Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580–2595.
<https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Reynolds, C. K., Kristensen, N. B. y Van Vuuren, A. M. (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*, 4(7), 1184–1196. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000911>
- Cantet, J. M., Yu, Z., Tucker, H. A. y Rius, A. G. (2023). A cinnamaldehyde feed additive improved feed use-efficiency in lactating dairy cows.

Livestock Science, 272, 105236.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105236>

- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A. y Kamel, C. (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 82(11), 3230–3236. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/82/11/3230/4790288>
- Cedrola, F., Rossi, M., Dias, R. J. P., Martinele, I. y D'Agosto, M. (2015). Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. *Zoological Science*, 32(1), 8–15. <https://doi.org/10.2108/zs140125>
- Chaney, A. L. y Marbach, E. P. (1962). Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia. *Clinical Chemistry*, 8(2), 130–132. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>
- Chapman, C. E., Ort, S. B., Aragona, K. M., Cabral, R. G. y Erickson, P. S. (2019). Effect of cinnamaldehyde on feed intake, rumen fermentation, and nutrient digestibility, in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*, 97(4), 1819–1827. <https://doi.org/10.1093/jas/skz050>
- Chaves, A. V., He, M. L., Yang, W. Z., Hristov, A. N., McAllister, T. A. y Benchaar, C. (2008). Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science*, 88(1), 117–122. <https://doi.org/10.4141/CJAS07061>
- Choudhury, P. K., Salem, A. Z. M., Jena, R., Kumar, S., Singh, R. y Puniya, A. K. (2015). Rumen Microbiology: An Overview. En A. K. Puniya, R. Singh y D. N. Kamra (eds.), *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (pp. 3–16). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_1
- Chung, Y.-H., Pickett, M. M., Cassidy, T. W. y Varga, G. A. (2008). Effects of Prepartum Dietary Carbohydrate Source and Monensin on Periparturient Metabolism and Lactation in Multiparous Cows. *Journal*

of Dairy Science, 91(7), 2744–2758. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0781>

Coates, D. B. y Penning, P. D. 2000. Measuring animal performance. En: L. t'Mannetje y R. M. Jones (ed.), *Field and Laboratory Methods for Grassland and Animal Production Research* (pp. 353-402). CABI International.

Committee on Nutrient Requirements of Dairy Cattle, Board on Agriculture and Natural Resources, Division on Earth and Life Studies y National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2021). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition* (p. 25806). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25806>

Costa, L. P. M., De Lima, L. S., Damasceno, J. C., De Marchi, F. E., Granzotto, F., Dos Santos, F. S., Santos, A. L. D. y Dos Santos, G. T. (2020). Combination of pelleting and monensin does not affect antioxidant properties and fatty acids in milk of grazing dairy cows supplemented with a concentrate containing soybean seeds. *Tropical Animal Health and Production*, 52(2), 573–581. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02044-4>

D'Agosto, M. y Carneiro, M. E. (1999). Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(3), 725–729. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000300011>

Do Prado, R. M., Côrtes, C., Benchaar, C. y Petit, H. V. (2015). Interaction of sunflower oil with monensin on milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 207, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.06.017>

Drong, C., Meyer, U., Soosten, D. von, Frahm, J., Rehage, J., Breves, G. y Dänicke, S. (2016). Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(3), 537–551. <https://doi.org/10.1111/jpn.12401>

- Duffield, T. F., Merrill, J. K. y Bagg, R. N. (2012). Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. *Journal of Animal Science*, 90(12), 4583–4592. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-5018>
- Duffield, T. F., Rabiee, A. R. y Lean, I. J. (2008a). A Meta-Analysis of the Impact of Monensin in Lactating Dairy Cattle. Part 1. Metabolic Effects. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1334–1346. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0607>
- Duffield, T. F., Rabiee, A. R. y Lean, I. J. (2008b). A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1347–1360. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0608>
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T. y Webster, G. (1989). A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1), 68–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0)
- Eifert, E. D. C., Lana, R. D. P., Lanna, D. P. D., Arcuri, P. B., Leão, M. I., Valadares Filho, S. D. C., Leopoldino, W. M. y Silva, J. H. S. D. (2005). Efeitos do fornecimento de monensina e óleo de soja na dieta sobre o desempenho de vacas leiteiras na fase inicial da lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(6), 2123–2132. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000600038>
- Elcoso, G., Zweifel, B. y Bach, A. (2019). Effects of a blend of essential oils on milk yield and feed efficiency of lactating dairy cows. *Applied Animal Science*, 35(3), 304–311. <https://doi.org/10.15232/aas.2018-01825>
- Erasmus, L. J., Robinson, P. H., Ahmadi, A., Hinders, R. y Garrett, J. E. (2005). Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 122(3–4), 219–239. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.03.004>

- Fajardo, M., Mattiauda, D. A., Motta, G., Genro, T. C., Meikle, A., Carriquiry, M. y Chilibraste, P. (2015). Use of mixed rations with different access time to pastureland on productive responses of early lactation Holstein cows. *Livestock Science*, 181, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.023>
- Fariña, S. R. y Chilibraste, P. (2019). Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Agricultural Systems*, 176, 102631. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.05.001>
- Firkins, J. L. (2021). Invited Review: Advances in rumen efficiency. *Applied Animal Science*, 37(4), 388–403. <https://doi.org/10.15232/aas.2021-02163>
- Firkins, J. L. y Mitchell, K. E. (2023). Invited review: Rumen modifiers in today's dairy rations. *Journal of Dairy Science*, 106(5), 3053–3071. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22644>
- Firkins, J. L. y Yu, Z. (2015). Ruminant Nutrition Symposium: How to use data on the rumen microbiome to improve our understanding of ruminant nutrition^{1,2}. *Journal of Animal Science*, 93(4), 1450–1470. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8754>
- Flores, A. J., Garciarena, A. D., Vieyra, J. M. H., Beauchemin, K. A. y Colombatto, D. (2013). Effects of specific essential oil compounds on the ruminal environment, milk production and milk composition of lactating dairy cows at pasture. *Animal Feed Science and Technology*, 186(1–2), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.09.001>
- Ghizzi, L. G., Del Valle, T. A., Takiya, C. S., Da Silva, G. G., Zilio, E. M. C., Grigoletto, N. T. S., Martello, L. S. y Rennó, F. P. (2018). Effects of functional oils on ruminal fermentation, rectal temperature, and performance of dairy cows under high temperature humidity index environment. *Animal Feed Science and Technology*, 246, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.009>

- Giannenas, I., Skoufos, J., Giannakopoulos, C., Wiemann, M., Gortzi, O., Lalas, S. y Kyriazakis, I. (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5569–5577. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4096>
- Grande, B. C., Falcón, M. S. G. y Gándara, J. S. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(1), 39–47. <https://doi.org/10.1080/11358120009487647>
- Green, B. L., McBride, B. W., Sandals, D., Leslie, K. E., Bagg, R. y Dick, P. (1999). The Impact of a Monensin Controlled-Release Capsule on Subclinical Ketosis in the Transition Dairy Cow. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 333–342. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75240-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75240-9)
- Grigoletto, N. T. S., Ghizzi, L. G., Gheller, L. S., Da S. Dias, M. S., Nunes, A. T., Silva, T. B. P., Da Silva, G. G., Costa E Silva, L. F., Lobato, D. N. y Rennó, F. P. (2021). Effects of a blend of live yeast and organic minerals or monensin on performance of dairy cows during the hot season. *Journal of Dairy Science*, 104(11), 11634–11645. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20194>
- Grummer, R. R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2820. <https://doi.org/10.2527/1995.7392820x>
- Haydock, K.P. y Shaw, N.H. (1975). The Comparative Yield Method for Estimating Dry Matter Yield of Pasture. *Australian Journal of Agriculture and Animal Husbandry*, 15, 663-670. <http://dx.doi.org/10.1071/EA9750663>
- Huang, Y., Marden, J. P., Julien, C. y Bayourthe, C. (2018). Redox potential: An intrinsic parameter of the rumen environment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(2), 393–402. <https://doi.org/10.1111/jpn.12855>

- Ipharraguerre, I. R. y Clark, J. H. (2003). Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 106(1–4), 39–57. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00065-8)
- Jasinsky, A., Mattiauda, D. A., Ceriani, M., Casal, A. y Carriquiry, M. (2019). Heat production and body composition of primiparous Holstein cows with or without grazing pastures in early lactation. *Livestock Science*, 225, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.04.017>
- Khiaosa-ard, R. y Zebeli, Q. (2013). Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants¹. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1819–1830. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5691>
- Kholif, A. E., Hassan, A. A., El Ashry, G. M., Bakr, M. H., El-Zaiat, H. M., Olafadehan, O. A., Matloup, O. H. y Sallam, S. M. A. (2021). Phytogetic feed additives mixture enhances the lactational performance, feed utilization and ruminal fermentation of Friesian cows. *Animal Biotechnology*, 32(6), 708–718. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1746322>
- Kholif, A. E. y Olafadehan, O. A. (2021). Essential oils and phytogetic feed additives in ruminant diet: Chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochemistry Reviews*, 20(6), 1087–1108. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09739-3>
- Kolling, G. J., Stivanin, S. C. B., Gabbi, A. M., Machado, F. S., Ferreira, A. L., Campos, M. M., Tomich, T. R., Cunha, C. S., Dill, S. W., Pereira, L. G. R. y Fischer, V. (2018). Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4221–4234. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13841>
- Kung, L., Williams, P., Schmidt, R. J. y Hu, W. (2008). A Blend of Essential Plant Oils Used as an Additive to Alter Silage Fermentation or Used as

- a Feed Additive for Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4793–4800. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1402>
- Kvidera, S. K., Horst, E. A., Abuajamieh, M., Mayorga, E. J., Fernandez, M. V. S. y Baumgard, L. H. (2017). Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 2360–2374. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12001>
- Larsen, M. y Kristensen, N. B. (2013). Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Animal*, 7(10), 1640–1650. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001171>
- Larsen, M., Galindo, C., Ouellet, D. R., Maxin, G., Kristensen, N. B. y Lapierre, H. (2015). Abomasal amino acid infusion in postpartum dairy cows: Effect on whole-body, splanchnic, and mammary amino acid metabolism. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7944–7961. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9439>
- Lemosquet, S., Raggio, G., Lobley, G. E., Rulquin, H., Guinard-Flament, J. y Lapierre, H. (2009). Whole-body glucose metabolism and mammary energetic nutrient metabolism in lactating dairy cows receiving digestive infusions of casein and propionic acid. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 6068–6082. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2018>
- Liu, Y. R., Du, H. S., Wu, Z. Z., Wang, C., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J., Zhang, Y. L., Pei, C. X. y Zhang, S. L. (2020). Branched-chain volatile fatty acids and folic acid accelerated the growth of Holstein dairy calves by stimulating nutrient digestion and rumen metabolism. *Animal*, 14(6), 1176–1183. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002969>
- Matloup, O. H., Abd El Tawab, A. M., Hassan, A. A., Hadhoud, F. I., Khattab, M. S. A., Khalel, M. S., Sallam, S. M. A. y Kholif, A. E. (2017). Performance of lactating Friesian cows fed a diet supplemented with coriander oil: Feed intake, nutrient digestibility, ruminal fermentation, blood chemistry, and milk production. *Animal Feed Science and Technology*, 226, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.02.012>

- Mathew, B., Eastridge, M. L., Oelker, E. R., Firkins, J. L. y Karnati, S. K. R. (2011). Interactions of monensin with dietary fat and carbohydrate components on ruminal fermentation and production responses by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(1), 396–409. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3580>
- Matthews, C., Crispie, F., Lewis, E., Reid, M., O'Toole, P. W. y Cotter, P. D. (2019). The rumen microbiome: A crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*, 10(2), 115–132. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1505176>
- Mattiauda, D. A., Tamminga, S., Gibb, M. J., Soca, P., Bentancur, O. y Chilbroste, P. (2013). Restricting access time at pasture and time of grazing allocation for Holstein dairy cows: Ingestive behaviour, dry matter intake and milk production. *Livestock Science*, 152(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.12.010>
- McArt, J. A. A., Nydam, D. V., Oetzel, G. R., Overton, T. R. y Ospina, P. A. (2013). Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal*, 198(3), 560–570. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.011>
- McCarthy, M. M., Yasui, T., Ryan, C. M., Mechor, G. D. y Overton, T. R. (2015). Performance of early-lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 3335–3350. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8820>
- McCarthy, C. S., Dooley, B. C., Branstad, E. H., Kramer, A. J., Horst, E. A., Mayorga, E. J., Al-Qaisi, M., Abeyta, M. A., Perez-Hernandez, G., Goetz, B. M., Castillo, A. R., Knobbe, M. R., Macgregor, C. A., Russi, J. P., Appuhamy, J. A. D. R. N., Ramirez-Ramirez, H. A. y Baumgard, L. H. (2020). Energetic metabolism, milk production, and inflammatory response of transition dairy cows fed rumen-protected glucose. *Journal of Dairy Science*, 103(8), 7451–7461. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18151>

- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A. y Newbold, C. J. (2003). Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 5011–5014. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003>
- Méndez, M. N., Grille, L., Mendina, G. R., Robinson, P. H., Adrien, M. D. L., Meikle, A. y Chilbroste, P. (2023). Performance of Autumn and Spring Calving Holstein Dairy Cows with Different Levels of Environmental Exposure and Feeding Strategies. *Animals*, 13(7), 1211. <https://doi.org/10.3390/ani13071211>
- Mezzetti, M., Piccioli-Cappelli, F., Bani, P., Amadori, M., Calamari, L., Minuti, A., Loor, J. J., Bionaz, M. y Trevisi, E. (2019). Monensin controlled-release capsule administered in late-pregnancy differentially affects rumination patterns, metabolic status, and cheese-making properties of the milk in primiparous and multiparous cows. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 1271–1283. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1645623>
- Molosse, V., Souza, C. F., Baldissera, M. D., Glombowsky, P., Campigotto, G., Cazaratto, C. J., Stefani, L. M. y Da Silva, A. S. (2019). Diet supplemented with curcumin for nursing lambs improves animal growth, energetic metabolism, and performance of the antioxidant and immune systems. *Small Ruminant Research*, 170, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.11.014>
- Moss, A. R., Jouany, J.-P. y Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, 49(3), 231–253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>
- Mullins, C. R., Mamedova, L. K., Brouk, M. J., Moore, C. E., Green, H. B., Perfield, K. L., Smith, J. F., Harner, J. P. y Bradford, B. J. (2012). Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1323–1336. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4744>

- Mutsvangwa, T., Walton, J. P., Plaizier, J. C., Duffield, T. F., Bagg, R., Dick, P., Vessie, G. y McBride, B. W. (2002). Effects of a Monensin Controlled-Release Capsule or Premix on Attenuation of Subacute Ruminal Acidosis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3454–3461. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74433-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74433-0)
- Nagaraja, T. G. (2016). Microbiology of the Rumen. En D. D. Millen, M. De Beni Arrigoni y R. D. Lauritano Pacheco (eds.), *Rumenology* (pp. 39–61). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_2
- Newbold, C. J., De La Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E. y McEwan, N. R. (2015). The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
- Newbold, C. J., El Hassan, S. M., Wang*, J., Ortega, M. E. y Wallace, R. J. (1997). Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *British Journal of Nutrition*, 78(2), 237–249. <https://doi.org/10.1079/BJN19970143>
- Oba, M. y Allen, M. S. (2003). Dose-Response Effects of Intrauminal Infusion of Propionate on Feeding Behavior of Lactating Cows in Early or Midlactation. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2922–2931. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73889-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73889-2)
- Odongo, N. E., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Or-Rashid, M. M., Hook, S. E., Gray, J. T., Kebreab, E., France, J. y McBride, B. W. (2007). Long-Term Effects of Feeding Monensin on Methane Production in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1781–1788. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-708>
- Oh, J., Harper, M., Lang, C. H., Wall, E. H. y Hristov, A. N. (2018). Effects of phytonutrients alone or in combination with monensin on productivity in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 7190–7198. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14439>
- Oh, S. Y., Yun, W., Lee, J. H., Lee, C. H., Kwak, W. K. y Cho, J. H. (2017). Effects of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm

- formation of Salmonella and Escherichia coli. *Journal of Animal Science and Technology*, 59(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0127-7>
- Owens, F. N. y Basalan, M. (2016). Ruminal Fermentation. En D. D. Millen, M. De Beni Arrigoni y R. D. Lauritano Pacheco (eds.), *Rumenology* (pp. 63–102). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_3
- Özkaya, S., Özkan, O., Erbas, S., Yalçın, I. G., Piwczynski, D. y Neja, W. (2022). Effect of Oreganum onites L. Aromatic Water Supplemented to Whole Milk on Performance, Blood Metabolites and Oxidative Status of Holstein Calves During the Pre-Weaning Period. *Pakistan Journal of Zoology*, 55(2). <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20211204091234>
- Patra, A. K. y Saxena, J. (2011). Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 24–37. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4152>
- Phillips, I. (2003). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), 28–52. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg483>
- Ranga Niroshan Appuhamy, J. A. D., Strathe, A. B., Jayasundara, S., Wagner-Riddle, C., Dijkstra, J., France, J. y Kebreab, E. (2013). Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 5161–5173. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5923>
- Reynolds, C. K., Aikman, P. C., Lupoli, B., Humphries, D. J. y Beever, D. E. (2003). Splanchnic Metabolism of Dairy Cows During the Transition From Late Gestation Through Early Lactation. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1201–1217. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73704-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73704-7)
- Rezaei Ahvanooei, M. R., Norouzian, M. A., Piray, A. H., Vahmani, P. y Ghaffari, M. H. (2023). Effects of monensin supplementation on lactation performance of dairy cows: A systematic review and dose–

- response meta-analysis. *Scientific Reports*, 13(1), 568. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27395-9>
- Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J. y Berry, D. P. (2009). Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5769–5801. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2431>
- Rodrigues, R. O., Cooke, R. F., Firmino, F. C., Moura, M. K. R., Angeli, B. F., Ferreira, H. A. O., Brandão, A. P., Gex-Fabry, M., Ostrensky, A. y Vasconcelos, J. L. M. (2019). Productive and physiological responses of lactating dairy cows supplemented with phytogenic feed ingredients. *Translational Animal Science*, 3(4), 1133–1142. <https://doi.org/10.1093/tas/txz108>
- Rossi, C. A. S., Grossi, S., Dell'Anno, M., Compiani, R. y Rossi, L. (2022). Effect of a Blend of Essential Oils, Bioflavonoids and Tannins on In Vitro Methane Production and In Vivo Production Efficiency in Dairy Cows. *Animals*, 12(6), 728. <https://doi.org/10.3390/ani12060728>
- Ruiz, R., Albrecht, G. L., Tedeschi, L. O., Jarvis, G., Russell, J. B. y Fox, D. G. (2001). Effect of Monensin on the Performance and Nitrogen Utilization of Lactating Dairy Cows Consuming Fresh Forage. *Journal of Dairy Science*, 84(7), 1717–1727. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74607-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74607-3)
- Saha, S. K. y Pathak, N. N. (2021). *Fundamentals of Animal Nutrition*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-9125-9>
- Santos, M. B., Robinson, P. H., Williams, P. y Losa, R. (2010). Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. *Animal Feed Science and Technology*, 157(1–2), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.02.001>
- Santos, M. C. B., Araújo, A. P. C., Venturelli, B. C., Freitas, J. E., Barletta, R. V., Gandra, J. R., De Paiva, P. G., Acedo, T. S. y Rennó, F. P. (2019). Effects of increasing monensin doses on performance of mid-lactating

- Holstein cows. *Journal of Applied Animal Research*, 47(1), 297–302.
<https://doi.org/10.1080/09712119.2019.1629298>
- Silva, G. G., Takiya, C. S., Del Valle, T. A., De Jesus, E. F., Grigoletto, N. T. S., Nakadonari, B., Cortinhas, C. S., Acedo, T. S. y Rennó, F. P. (2018). Nutrient digestibility, ruminal fermentation, and milk yield in dairy cows fed a blend of essential oils and amylase. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 9815–9826. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14789>
- Silva, R. B. D., Pereira, M. N., Araujo, R. C. D., Silva, W. D. R. y Pereira, R. A. N. (2020). A blend of essential oils improved feed efficiency and affected ruminal and systemic variables of dairy cows. *Translational Animal Science*, 4(1), 182–193. <https://doi.org/10.1093/tas/txz183>
- Silva, S. N. S. E., Chabrilat, T., Kerros, S., Guillaume, S., Gandra, J. R., De Carvalho, G. G. P., Silva, F. F. D., Mesquita, L. G., Gordiano, L. A., Camargo, G. M. F., Ribeiro, C. V. D. M., De Araújo, M. L. G. M. L., Alba, H. D. R., E Silva, R. D. G. y Freitas Jr., J. E. D. (2021). Effects of plant extract supplementations or monensin on nutrient intake, digestibility, ruminal fermentation and metabolism in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 275, 114886. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114886>
- Silvestre, T., Martins, L. F., Cueva, S. F., Wasson, D. E., Stepanchenko, N., Räisänen, S. E., Sommai, S., Hile, M. L. y Hristov, A. N. (2023). Lactational performance, rumen fermentation, nutrient use efficiency, enteric methane emissions, and manure greenhouse gas-emitting potential in dairy cows fed a blend of essential oils. *Journal of Dairy Science*, 106(11), 7661–7674. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23181>
- Silvestre, T., Räisänen, S. E., Cueva, S. F., Wasson, D. E., Lage, C. F. A., Martins, L. F., Wall, E. y Hristov, A. N. (2022). Effects of a combination of Capsicum oleoresin and clove essential oil on metabolic status, lactational performance, and enteric methane emissions in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 105(12), 9610–9622. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22203>

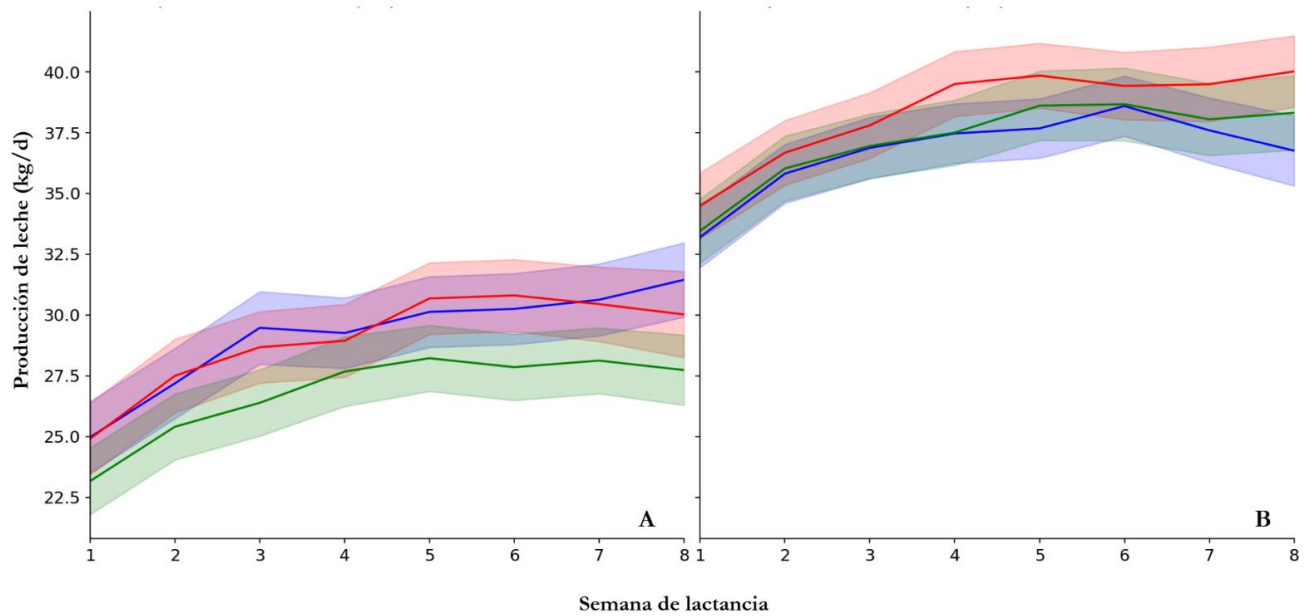
- Spanghero, M., Robinson, P. H., Zanfi, C. y Fabbro, E. (2009). Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 153(1–2), 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.06.004>
- Tager, L. R. y Krause, K. M. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2455–2464. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3505>
- Tassoul, M. D. y Shaver, R. D. (2009). Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1734–1740. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1760>
- Tekippe, J. A., Tacoma, R., Hristov, A. N., Lee, C., Oh, J., Heyler, K. S., Cassidy, T. W., Varga, G. A. y Bravo, D. (2013). Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7892–7903. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7128>
- Tomkins, N. W., Denman, S. E., Pilajun, R., Wanapat, M., McSweeney, C. S. y Elliott, R. (2015). Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensin in beef cattle fed a tropical grass hay. *Animal Feed Science and Technology*, 200, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.11.013>
- Ungerfeld, E. M. (2018). Inhibition of Rumen Methanogenesis and Ruminant Productivity: A Meta-Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 113. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00113>
- Van Den Bossche, T., Goossens, K., Ampe, B., Tamassia, L. F. M., De Boever, J. L. y Vandaele, L. (2024). Effect of supplementing an α -amylase enzyme or a blend of essential oil components on the performance, nutrient digestibility and nitrogen balance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, S0022030224004867. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24073>

- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press.
- Varga, G. A., Meisterling, E. M., Dailey, R. A. y Hoover, W. H. (1984). Effect of Low and High Fill Diets on Dry Matter Intake, Milk Production, and Reproductive Performance During Early Lactation. *Journal of Dairy Science*, 67(6), 1240–1248. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81430-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81430-7)
- Villalba, J. J., Provenza, F. D. y Han, G. (2004). Experience influences diet mixing by herbivores: Implications for plant biochemical diversity. *Oikos*, 107(1), 100–109. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.12983.x>
- Wall, E. H., Doane, P. H., Donkin, S. S. y Bravo, D. (2014). The effects of supplementation with a blend of cinnamaldehyde and eugenol on feed intake and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5709–5717. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7896>
- Wang, K., Xiong, B. y Zhao, X. (2023). Could propionate formation be used to reduce enteric methane emission in ruminants? *Science of the Total Environment*, 855, 158867. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158867>
- Weimer, P. J. (2015). Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00296>
- Williams, A. G. y Coleman, G. S. (1992). *The Rumen Protozoa*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2776-2>
- Yang, W. Z., Benchaar, C., Ametaj, B. N., Chaves, A. V., He, M. L. y McAllister, T. A. (2007). Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5671–5681. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0369>
- Zhan, J., Liu, M., Su, X., Zhan, K., Zhang, C. y Zhao, G. (2017). Effects of alfalfa flavonoids on the production performance, immune system, and

ruminal fermentation of dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(10), 1416–1424.
<https://doi.org/10.5713/ajas.16.0579>

8. Anexos

8.1 Producción de leche estimada a partir de modelo estadístico diferente



Nota. Los datos fueron analizados utilizando el programa SAS (SAS OnDemand) mediante el procedimiento GLIMMIX. Efecto fijos del modelo: Tratamiento y días en leche. Efectos aleatorio: Animal. Covariable: Peso vivo al parto.

8.2 Phytochemicals and monensin in dairy cows: impact on productive performance and rumen fermentation profile

L. Gonzalez¹, M.A. Bruni¹, A.C. Dall-Orsoletta³, P. Chilibroste¹, A. Meikle², M.L. Adrien², A. Casal¹, J.P. Damián², H. Naya¹, M. Arturo-Schaan³, D.A. Mattiauda¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay

²Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³Deltavit, CCPA Group, ZA du Bois de Teillay, Janzé, France.

Lucas González Chappe, 65100, (+598) 091285766,

Lucasgonzalezchappe@hotmail.com

Interpretative Summary

Global warming and the use of antibiotics in livestock farming are public concerns. Monensin, one of the most used antibiotics in livestock, has been banned in Europe and its use is increasingly questioned. The search for additives that improve the health and efficiency of animals without generating bacterial resistance or human health risk is an opportunity in the dairy industry. Phytochemicals are promising compounds in this regard, but their effectiveness is linked to the base diet of the animals among other factors. Understanding their effect on dairy grazing systems during the transition period may provide an alternative and it is a challenge for researchers.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of phytochemicals and sodic monensin as rumen modifiers on dry matter intake (DMI), body condition score (BCS), milk yield and composition, ruminal fermentation characteristics and ruminal protozoa during the transition period of dairy grazing cows. In a completely randomized design balanced for expected calving date and parity, thirty-six multiparous and twenty-four primiparous Holstein cows (9 of which were ruminally fistulized) were randomly assigned to one of three treatments: 1) total mixed ration (**TMR**) without additive (CTL), 2) TMR supplemented with 0.3 g/cow/day of sodic monensin (**MON**), and 3) TMR supplemented with 50

g/cow/day of a mix of phytochemicals (**PHY**) from 30 days before calving to 60 days after calving.

Before calving, the cows were fed TMR (70:30 forage: concentrate on a dry matter (DM) basis). After calving, they grazed and were supplemented with TMR (45:55 forage:concentrate on a DM basis). Prepartum DMI was estimated daily by the difference between feed offered and rejected, while postpartum DMI was estimated by energy balance at 30 and 60 days in milk. Postpartum milk yield was recorded daily, and samples to milk composition were taken weekly. Ruminal fermentation was evaluated at three periods: 7 days before calving, and 30 and 60 days after calving. Samples were taken just before feeding and 4, 8, 16, and 24 hours post feeding over two consecutive days. During the prepartum period, DMI was lower in primiparous cows in the MON group compared to the PHY and CTL groups. In multiparous cows, treatments did not affect milk yield or composition, but, in primiparous cows, milk yield was higher in the PHY and MON treatments compared to the CTL group (28.5, 28.7 vs. 26.5 ± 0.76 kg/day, respectively). The percentage of lactose in milk was also higher in the PHY and MON groups than in the CTL. Before calving, treatments did not affect ruminal pH, ammonia (**NH₄**), total volatile fatty acids (**VFA**), or the proportion of main **VFAs** (acetate, propionate, butyrate). However, isovalerate was higher in the PHY group and valerate was lower in the MON group compared to the CTL group. Both additives reduced protozoa concentration by 39%. Postpartum, ruminal pH, acetate proportion and acetate to propionate ratio were not affected by treatments. However, butyrate, isobutyrate and **NH₄** concentrations were lower in the PHY group, and valerate concentration was lower in the MON group. The PHY and MON treatments resulted in lower isovalerate concentrations and reduced protozoa concentrations. The ruminal fermentation profile was influenced by different physiological and environmental conditions before and after calving and supplementation with PHY or MON. Under the conditions of this study,

including MON or PHY in the diet can improve production in primiparous cows through positive effects on rumen metabolism.

Keywords: phytochemicals, ruminal fermentation, milk yield

Introduction

The dairy farms face the challenge of enhancing milk yield and quality while ensuring animal welfare and environmental sustainability. One approach is the strategic use of dietary additives manipulating ruminal fermentation to improve performance and efficiency (Kholif and Olafadehan, 2021) and reduce environmental impact (Firkins, 2021).

Ionophore antibiotics, phytonutrients, enzymes, yeasts and fungi, and specific nutrients (sugars, amino acids, fatty acids, minerals and vitamins, among others) have been investigated and employed as modulators of ruminal fermentation. One of the best known and used is monensin, its use leads to favorable impacts on efficiency, improving nitrogen and energy ruminal utilization (Drong et al., 2016; Erasmus et al., 2005; Firkins, 2021; Green et al., 1999). In this sense, monensin supplementation has shown the capacity to increase milk yield in dairy cows and decrease intake, increasing feed efficiency (Duffield et al., 2008a, 2008b; Rezaei Ahvanooei et al., 2023). Despite these favorable effects, there is a public concern about its use in animal production, given the emergence of bacterial strains resistant to multiple antibiotics; this has led to exploring viable and sustainable alternatives to address this problem (Calsamiglia et al., 2007).

Plants produce an extensive synthesis of organic compounds through their secondary metabolism, known as phytochemicals, which exhibit antimicrobial capacities against a wide range of bacteria, yeasts and molds (Calsamiglia et al., 2007). Their phytochemical properties make them attractive as potential feed additives capable of influencing the dynamics of rumen fermentation (Benchaar et al., 2008).

Supplementation with phytochemicals has altered ruminal fermentation through modifications in the ruminal microbiota (Cardozo et al., 2004; Kholif and Olafadehan, 2021). The effect of phytochemicals on volatile fatty acid (VFA) production has been inconsistent (Bodas et al., 2012; Kholif and Olafadehan, 2021). Studies have demonstrated their ability to reduce ammonia (NH₄) concentration, mainly influencing the reduction of protozoa (Bodas et al., 2012) or reductions in methane production, by directly inhibiting methanogenic archaea or by suppressing metabolic processes involved in methanogenesis (Kholif and Olafadehan, 2021).

The impact of phytochemicals on dry matter intake (DMI) depends on diet composition (Kholif and Olafadehan, 2021). Improvements in milk production and efficiency have been observed with the use of essential oils combined with polyphenols (Rodrigues et al., 2019; Silva et al., 2020; Tassoul and Shaver, 2009). Phytochemicals have been assessed in confinement systems, underscoring the significance of evaluating these additives within typical South American systems, where a substantial portion of the animal's diet originates from pasture.

In this context, we hypothesize that the addition of a mixture of phytochemical or monensin to the diets of dairy cows in mixed systems improves the productive performance and efficiency of nitrogen and energy utilization in the rumen without differences between them. We worked with a mix of polyphenols (up to 450 ppm), curcuminoides (up to 280 ppm), piperine (up to 15 ppm) and transcinnamaldehyde (up to 1000 ppm). The objective of this study was to evaluate the use of a mixture of phytochemical or monensin compared with a control (without additives) during prepartum and early lactation in grazing dairy cows on DMI, milk yield and composition, and ruminal fermentation characteristics.

Materials and Methods

The experiment was conducted at the Estación Experimental Dr. Mario A. Cassinoni (EEMAC) of the Facultad de Agronomía (Paysandú, Uruguay, 32°

S, 58° W) of the Universidad de la República (Udelar). Animal procedures were conducted under the approval of the Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) of the Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (proceeding number: 020300-000055-22).

Cows, Experimental Design and Management

Sixty Holstein cows (24 primiparous and 36 multiparous) were used. At the beginning of the study, the animals presented 581 ± 14.0 kg of body weight (**BW**); 3.36 ± 0.27 body condition score (**BCS**); scale 1-5 (Edmoson et al., 1989) and 655 ± 12 kg BW and 3.24 ± 0.31 BCS for primiparous and multiparous cows, respectively. They were assigned to a complete randomized design with randomization restricted to balance for expected calving date and parity. Nine of primiparous cows were fistulated with ruminal cannulas (Kehl® Indústria e Comércio LTDA, ME, Brasil).

The cows were assigned to one of the 3 treatments: 1) total mixed ration (**TMR**) without additive (**CTL**), 2) TMR supplemented with 0.30 g/cow/d of sodic monensin (**MON**) and 3) TMR supplemented with 50 g/cow/d of a mix of phytochemical (**PHY**). Prepartum cows were fed with a TMR formulated to cover the nutritional requirements of cows according to the National Research Council (NRC, 2001), containing the premix of minerals and additive treatments (PHY or MON; Table 1). Cows were managed in a compost barn as mentioned by Pons et al. (2023). After calving and for the first 60 days of lactation, the cows had a daily grazing shift (7:00 to 14:00) and were supplemented with a TMR (containing the additives in the corresponding groups) formulated to sustain a production of 36 L, estimating a consumption of 10 kg of dry matter (**DM**) of pasture (Table 1).

Table 1. Ingredient and chemical composition (means±SD) of the TMR (basal diet)

Ingredient (% of DM)	Prepartum	Postpartum
Corn Silage	38.7	30.8
Barley Straw	31.4	-
Alfalfa Hay	-	13.7
Soybean Meal	16.2	13.7
Grain Corn	4.36	27.4
Wheat Bran	4.42	-
Barley grain	-	7.75
Calcium carbonate	1.35	1.70
Sodium chloride	-	0.69
HCO ₃	-	0.68
Magnesium oxide	-	0.67
Monocalcium phosphate	-	0.67
Sulfur	-	1.75
Semitin wheat	-	1.75
Mineral and Vitamin supplement ¹	3.45	0.33
Chemical Composition		
OM	90.6±1.34	91.3±0.44
CP	10.8±1.48	12.8±0.96
NDF	44.2±2.51	26.8±3.44
ADF	25.9±1.02	14.0±1.50
Digestible Energy (Mcal/ Kg of DM)	2.86±0.01	3.07±0.01
NEL ² (Mcal/ Kg of DM)	1.47±0.01	1.67±0.01

¹ Contained in prepartum: -9831 meq/kg, 6% Mg, 0.20% K, 2% Na, 16% Cl, 10.00 S, 10 Ca, 250 mg/Kg Cu, 8.0 mg/Kg Se, 1200 mg/Kg Zn, 9 mg/Kg I, 2.4 mg/Kg Co, 210.00 UI/Kg vitamin A, 90.000 UI/Kg vitamin D, 2.400 UI/Kg vitamin E. In postpartum: 20.000 mg/Kg Zn, 4.000 mg/Kg Cu, 120 mg/Kg Se, 160 mg/Kg I, 40 mg/Kg Co, 1.200.00 UI/Kg vitamin A, 240.000 UI/Kg vitamin D3, 8.400 UI/Kg vitamin E.

² Calculated as NEL of TMR (Mcal/kg) = 1.909 – (0.017 × ADF).

To determine the appropriate paddock sizes, herbage mass was calculated weekly using a double sampling technique adapted from Haydock and Shaw (1975). Every week, three replicate sets of three sampling locations were selected within the areas to be grazed. The three locations were chosen according to their height to represent a high, medium and low herbage mass. At each location, sward height was measured using a sward stick and squares of 30x30 cm on the same area were cut to ground level with scissors. The cut herbage was collected and weighed for determination of DM content to

calculate herbage DM mass and derive a linear regression relating with sward height. The same procedure was used to determine the final mass at the end of the grazing week. The characteristics of the pasture are presented in table 2.

Sampling and Chemical analysis

The TMR offered was sampled weekly, a subsample was taken from each feeder immediately after the animals were fed to compose a representative sample of each treatment. Refusal was collected weekly and was used to estimate DMI. The samples of feed were analyzed weekly, and an average of the entire period was made. Samples of pasture selected by cows were plucked by hand with an adapted technique from Coates and Penning (2000). Samples of pasture were composed by grazing resource.

Table 2. Chemical composition of the pasture representative of what was selected by the cows offered to the control (CTL), monensin (MON) and Phytochemicals (PHY), in the first 60 days of lactation (means $\pm$ SD of treatment)

Item	Herbage				
	Tall fescue	Lucerne	Chicory	Lucerne	Oat
Sward mass (kg DM)	2921.2 $\pm$ 721.0	2091.6 $\pm$ 82.0	2936.1 $\pm$ 826.1	2069.5 $\pm$ 960.8	1764.0 $\pm$ 100.4
Pregrazing sward height (cm)	15.0 $\pm$ 1.28	28.8 $\pm$ 4.5	22.4 $\pm$ 0.56	20 $\pm$ 3.10	22 $\pm$ 4.5
Postgrazing sward height (cm)	13.9 $\pm$ 1.3	18.3 $\pm$ 4.2	18.6 $\pm$ 4.5	15.0 $\pm$ 3.4	15.2 $\pm$ 0.6
DM (%)	27.0 $\pm$ 3.8	27.4 $\pm$ 2.5	13.8 $\pm$ 1.9	26.2 $\pm$ 1.7	22.6 $\pm$ 2.2
OM (%)	88.3 $\pm$ 0.8	90 $\pm$ 0.2	84.6 $\pm$ 0.7	89.7 $\pm$ 0.7	88.1 $\pm$ 0.2
CP (%)	17.3 $\pm$ 0.2	17.4 $\pm$ 1.3	18.3 $\pm$ 0.9	17.3 $\pm$ 2.6	16.5 $\pm$ 0.4
NDF (%)	45.4 $\pm$ 1.1	41.6 $\pm$ 3.9	27.4 $\pm$ 3.1	34.1 $\pm$ 4.2	35.5 $\pm$ 1.0
ADF (%)	25.4 $\pm$ 0.2	24.3 $\pm$ 1.3	18.6 $\pm$ 01.7	22.0 $\pm$ 2.3	21.7 $\pm$ 0.8

All samples were dried at 60 °C in an air force oven until constant weight and were ground through a Wiley mill (Thomas Scientific) using 1 mm screen for chemical analysis. DM (AOAC 967.03), ash (AOAC 942.05), ether extract (**EE**, AOAC 920.39 A) and nitrogen (**N**, AOAC, 984.13) contents were determined according to the procedure of the AOAC (1990). Organic matter (**OM**) was

calculated as DM minus ash. Crude protein (**CP**) was calculated as $N \times 6.25$. The neutral detergent (**NDF**) and acid detergent fiber (**ADF**) were determined according to Van Soest et al. (1991), using an ANKOM 200 Fiber Analyzer® (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA) without sodium sulfite, with and heat stable amylase and expressed as ash free. Data (Mean±SD) of chemical composition of the TMR offered is shown in table 1. The chemical composition of the different forages offered is shown in table 2.

Dry Matter intake

Dry matter intake of TMR was calculated as the difference between the amount offered and the amount of feed rejected or wasted. During the prepartum, DMI of TMR was measured daily in each pen, while in the postpartum period it was measured weekly for each treatment and category. Pasture DMI (kg DM/cow) was estimated for 30 and 60 days in milk (**DIM**) by energy balance. Individual net energy of lactation (**NE_L**) intake was calculated based on requirements using equations from the National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine for dairy cattle (NASEM, 2021). Pasture DMI was estimated as the kg of pasture needed to provide the remaining energy to meet the **NE_L** requirements of cows that did not come from TMR. The **NE_L** provided by the pasture and the TMR were calculated as described by Méndez et al. (2023). Cow **NE_L** and NE for maintenance requirements were estimated as described in NASEM 2021, considering the energy contributed or required by the cow for gain of BW and BCS.

Milk Yield, Milk Composition and Feed use-efficiency

Cows were milked twice daily, at 4:00 a.m. and 4:00 p.m., and their individual milk yields were recorded daily using automatic milk meters that were synchronized with DairyPlan® software (GEA Farm Technologies, Düsseldorf, Germany). Milk composition analysis, including fat, protein, lactose and urea content, were determined once weekly by mid infrared spectrophotometry (MilkoScan FossElectric FT2®, Drachten, The Netherlands). Milk samples were taken during both milkings of the day and daily milk composition was

weighted for differences in milk production between morning and afternoon milkings. Total milk solids (**TS**) were calculated from the sum of lactose, protein and fat yield (kg/d). Feed use-efficiency was determined as the ratio of milk yield to DMI. Energy corrected milk (**ECM**) was calculated according to the NRC (2001) as follows: $ECM (Mcal NEL/d) = ((0.0929 \times kg\ fat) + (0.0547 \times kg\ protein) + (0.0395 \times kg\ lactose)) \times 100$

Ruminal Fermentation Characteristic and Protozoa Concentration

Ruminal fluid samples were collected from fistulated cows (3/treatment) at 7 days before calving, 30 and 60 days after calving, in all periods the cows were grazing on lucerne. The samples were collected using a manual extraction device equipped with a screening tube in the last part. Samples were collected for 2 consecutive days at 0, 4, 8, 16, and 24 hours relative to morning feeding for the determination of pH, NH₄ and VFA. The samples were preserved according to the method described by Mattiauda et al. (2013). Immediately after collection, pH was measured using a portable pH-meter (Oakton®, Eutech Instruments, Malaysia). The VFA and NH₄ samples were centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4 °C and stored at -20 °C until analysis. The VFA concentration was determined using gas chromatography. NH₄ concentration was determined using spectrophotometry according to the method of Chaney and Marbach (1962). To determine protozoa concentration, a subsample was saved in a 1:1 ratio with formalin (10%) and stored at 4 °C until counting, protozoa count was performed using a double reticular Neubauer chamber (Neubauer improved, Marienfeld Superior, Germany). The observation solution was prepared by mixing 1 mL of preserved sample with 3 drops of Lugol (5%), and later diluting it in 9 mL of glycerol (30%). The solution was left to stand for 15 minutes, as described by Cedrola et al. (2015) and D'Agosto and Carneiro (1999), before being observed using an optical microscope (Labomed CxL, USA) at a magnification of 10x.

Statistical Analysis

The data was analyzed using the SAS program (SAS OnDemand). Data was analyzed as a completely randomized design using proc GLIMMIX; data collected at different time intervals were analyzed as repeated measures. Data of DMI, BCS, milk yield and composition were analyzed separately by parity. Prepartum DMI was analyzed including treatment as fixed effect and pen nested in treatment as random effect on the model; feed supply was included as covariate. In postpartum DMI, the model included the fixed effect of treatment, DIM (30 and 60) and their interactions as fixed effects, BW as covariate and the cow as random effect. Statistical model for BCS includes the effects of treatment, week and their interaction, and BCS at the beginning of the experiment was used as covariate. Milk yield and composition were analyzed including in the statistical model treatment as fixed effect and cow as random effect, and the BW at calving, DIM and DIM² were used as covariates. The model for analyzing ruminal fermentation data (VFA, NH₄, pH and protozoa) was analyzed separately before and after calving. The model included treatment, hour for prepartum and hour nested in period (in postpartum) as fixed effects and their interactions, and the cows as a random effect. The post hoc analyzes were carried out through the Tukey-Kramer test. Significant differences were considered when $P \leq 0.05$ and tendency $P \leq 0.10$.

Results

Dry Matter Intake and Body Condition Score

MON primiparous cows had lower DMI (as percentage of BW) during the prepartum period than PHY ($P=0.03$) and CTL ($P<0.01$) cows ($1.88 \pm 0.02\%$ vs $1.98 \pm 0.03\%$ and $2.06 \pm 0.03\%$, respectively). Supplementation with additives do not affect DMI in multiparous prepartum cows (CTL: $2.21 \pm 0.07\%$, MON: $2.17 \pm 0.07\%$, PHY $2.14 \pm 0.07\%$; $P=0.574$). None of the feed additives affected DMI in the postpartum. The DMI for multiparous cows was $3.83 \pm 0.10\%$, whereas for primiparous cows it was $3.68 \pm 0.10\%$. In multiparous cows the BCS was not affected by the treatments. In primiparous, BCS tended ($P=0.08$)

to be greater in MON than in CTL cows, while PHY was intermediate. BCS was affected by the week ($P<0.01$) caused by a decrease BCS during postpartum (Table 2).

Table 3. Body condition score (BCS) before and after calving for multiparous (M) and primiparous (P) cows fed with TMR without supplementation (CTL) or supplemented with monensin (MON) or phytochemicals (PHY)

Item	Treatment					P-value		
	CTL	MON	PHY	SEM	T ²	Week	T*Week	BCSi ³
BCS (P)	3.09	3.21	3.13	0.04	0.10	<0.01	0.29	0.05
BCS (M)	3.01	2.98	3.00	0.03	0.97	<0.01	0.58	0.26

a, b Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

²Probability of treatment effect: effects of feed additives supplementation.

³Initial body condition score.

Milk Yield and Composition

Milk performance data are shown in Table 4 for primiparous and in Table 5 for multiparous cows. In primiparous cows the additives supplied in the diet resulted in a greater ($P=0.01$) milk yield and greater ($P=0.04$) milk lactose concentration. Neither fat, protein, milk urea nitrogen (**MUN**) concentration, milk TS, ECM or feed efficiency (kg of milk/kg of DMI) was changed by additives supplied in the diet.

Table 4. Milk yield and composition in primiparous cows fed with TMR without supplementation (CTL) or supplemented with monensin (MON) or phytochemicals (PHY)

	Treatment					P-value		
Item	CTL	MON	PHY	SEM	T ⁵	BW ⁶	DIM ⁷	DIM ²
Production								
Milk yield	26.5b	28.5a	28.7a	0.52	0.01	0.01	<0.01	<0.01
ECM ¹	19.5	21.0	20.2	0.86	0.50	0.47	0.21	0.41
TMS ² (kg/d)	3.24	3.49	3.39	0.13	0.44	0.49	0.06	0.19
Feed ³	1.44	1.45	1.51	0.04	0.54	-	-	-
Composition								
Fat	3.71	3.73	3.59	0.15	0.53	0.49	<0.01	<0.01
Protein	3.38	3.46	3.31	0.05	0.22	0.97	<0.01	<0.01
Lactose	4.88b	5.00a	4.99a	0.05	0.04	0.55	<.001	<.0.01
Yield (kg/d)								
Fat	0.99	1.05	1.02	0.05	0.76	0.28	0.38	0.55
Protein	0.91	0.98	0.94	0.03	0.35	0.45	0.30	0.52
Lactose	1.30	1.43	1.42	0.04	0.11	0.49	<0.01	<0.01
MUN ⁴ (mg/dl)	14.2	14.5	13.0	0.99	0.54	0.69	0.14	0.29

a, b Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹ECM= energy corrected milk (Mcal/d) = ((0.0929* kg fat) + (0.0547*kg protein) + (0.0395*kg lactose)) *100 (NRC, 2001)

²TMS=total solid in milk= kg fat + kg protein + kg lactose.

³Feed efficiency=milk(kg/d)/Dry matter intake (kg/d)

⁴MUN=urea nitrogen in milk.

⁵Probability of treatment effect: effects of feed additives supplementation

⁶BW= body weight

⁷DIM = days in milk

For multiparous cows, PHY tends ($P=0.07$) to produce less milk than MON, and CTL was intermediate. We observed no effect in milk composition, ECM, TS or milk or efficiency. However, MON tends ($P=0.08$) to have higher MUN concentration.

Table 5. Milk yield and composition in multiparous cows fed with TMR without supplementation (CTL) or supplemented with monensin (MON) or phytochemicals (PHY).

	Treatment					P-value		
Item	CTL	MON	PHY	SEM	T ⁵	BW ⁶	DIM ⁷	DIM ²
Production								
Milk yield	36.9	37.7	36.0	0.48	0.07	<0.01	<0.01	<0.01
ECM ¹	25.9	26.3	25.5	0.55	0.50	<0.01	0.18	0.26
TS (kg/d) ²	4.31	4.41	4.28	0.09	0.55	<0.01	0.04	0.10
Feed ³	1.56	1.59	1.61	0.03	0.56	-	-	-
Composition								
Fat	3.68	3.54	3.44	0.09	0.19	0.61	<0.01	0.01
Protein	3.41	3.31	3.33	0.04	0.29	0.78	<0.01	<0.01
Lactose	4.83	4.88	4.88	0.03	0.56	0.93	<0.01	<0.01
Yield (kg/d)								
Fat	1.30	1.32	1.25	0.03	0.21	<0.01	0.52	0.50
Protein	1.23	1.24	1.22	0.03	0.83	<0.01	0.23	0.36
Lactose	1.73	1.84	1.78	0.04	0.25	0.01	<0.01	<0.01
MUN (mg/dl) ⁴	13.4	15.4	13.6	0.62	0.08	0.69	0.13	0.47

^{a, b} Means within a row with different superscripts differ (P < 0.05).

¹ECM= energy corrected milk (Mcal/d) = ((0.0929* kg fat) + (0.0547*kg protein) + (0.0395*kg lactose)) *100 (NRC, 2001)

²TMS=total solid in milk= kg fat + kg protein + kg lactose.

³Feed efficiency= milk (kg/d)/Dry matter intake (kg/d)

⁴MUN=urea nitrogen in milk.

⁵Probability of treatment effect: effects of feed additives supplementation

⁶BW= body weight

⁷DIM = days in milk

Rumen Fermentation Characteristics and Protozoa

Ruminal pH, NH₄, VFA and protozoa before calving are presented in Table 6. We did not find additives effect in ruminal pH, NH₄ total VFA, as well as in the proportion of the main VFA (acetate, propionate and butyrate), or acetate to propionate ratio. The percentage of isovalerate was higher (P=0.07) and the proportion of isobutyrate tended to be higher (P=0.08) in PHY cows compared to CTL cows. In contrast, valerate tended (P=0.08) to be higher in CTL cows compared to MON cows (table 6). Protozoa concentration was lower (P<0.01) in MON and tended (P=0.10) to be lower in PHY cows compared to CTL cows, without differences between additives.

Table 6. Effect of dietary treatment on ruminal fermentation characteristics and protozoa density 7 days before calving in cows fed a TMR without supplementation (CTL) or supplemented with monensin (MON) or phytochemicals (PHY)

Rumen measure	Treatment			SEM	T ³	P-value	
	CTL	MON	PHY			Time	T*time
Ruminal pH	6.50	6.53	6.66	0.06	0.18	<0.01	0.83
Ammonia (ppm)	101.01	101.16	77.30	9.70	0.14	0.20	0.36
Total, VFA, mmol/L	91.47	94.80	103.17	7.95	0.57	0.33	0.99
Acetate (%)	62.94	64.66	61.14	1.56	0.24	0.12	0.96
Propionate (%)	23.23	23.15	22.16	0.89	0.63	0.40	0.77
Butyrate (%)	11.11	11.01	11.63	0.97	0.88	0.07	0.98
Isovalerate (%)	0.79	0.86	1.16	0.10	0.06	0.19	0.99
Valerate (%)	1.18a	0.96b	1.16ab	0.07	0.05	0.02	0.99
Isobutyrate (%)	0.43	0.46	0.57	0.04	0.07	<0.01	0.89
C2/C3 ¹	2.72	2.91	2.73	0.16	0.64	0.32	0.99
C2+C4/C3 ²	3.22	3.27	3.48	0.17	0.55	0.46	0.90
Protozoa cel/ml x10 ⁴	12.28a	6.72b	8.23ab	1.35	0.01	0.01	0.88

a, b Means within a row with different superscripts differ (P < 0.05).

¹ Acetate: propionate ratio

² Cetogenic: glucogenic ratio

³ Probability of treatment effect, effects of feed additives supplementation

The sampling time affected ruminal pH, isovalerate, valerate proportions and protozoa concentration. There was no observed interaction between treatment and time for any parameters during the prepartum period. In the postpartum there was no effect of treatment in ruminal pH, but period of sampling, time and the interactions treatment by period and treatment by time were significant (Table 7).

Table 7. Effect of dietary treatment on ruminal fermentation characteristic and protozoa density after calving (30 and 60 days) in cows fed a TMR without supplementation (CTL) or supplemented with monensin (MON) or phytochemicals (PHY).

Rumen measure	Treatment					P-value			
	CTL	MON	PHY	SEM	T ³	Time	Per ⁴	T* Per	T* time
Ruminal pH	6.49	6.51	6.49	0.03	0.90	<0.01	<0.01	0.04	0.01
Ammonia (ppm)	89.35a	82.01a	65.75b	2.59	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Total VFA (mmol/L)	120.46	109.73	108.90	3.85	0.09	<0.01	0.95	0.02	0.91
Acetate (%)	60.98	61.08	60.86	0.54	0.96	<0.01	0.70	0.01	0.99
Propionate (%)	24.30	25.24	26.11	0.55	0.08	0.20	0.14	0.02	0.99
Butyrate (%)	12.32a	11.61a	10.50b	0.28	0.01	<0.01	0.01	0.50	0.61
Isovalerate (%)	0.83a	0.63b	0.65b	0.03	0.01	<0.01	0.05	0.44	0.96
Valerate (%)	1.56a	1.18b	1.42a	0.07	0.01	0.24	0.14	0.05	0.69
Isobutyrate (%)	0.33a	0.32a	0.28b	0.01	0.01	<0.01	0.18	<0.05	0.65
C2/C3 ¹	2.57	2.45	2.38	0.07	0.24	0.04	0.48	0.02	0.99
C2+C4/C3 ²	3.07	2.91	2.78	0.09	0.09	0.40	0.61	0.03	0.98
Protozoa cel/ml	11.55a	7.11b	4.03b	1.10	<0.01	0.62	0.02	0.17	0.99

a, b Means within a row with different superscripts differ (P < 0.05).

¹ Acetate: propionate ratio

² Cetogenic: glucogenic ratio

³ Probability of treatment effect, effects of feed additives supplementation

⁴ Period of ruminal sampling (30 and 60 days in the postpartum)

The pH values were greater at 30 days than at 60 days postpartum (p<0.01). The pH was stable in all treatments in the first 8 hours, when the cows were grazing (Figure 1A, B). At day 30 postpartum, the ruminal pH of PHY and MON cows decreased at 16 hours post feeding and increased (P=0.01) significantly at 24 hours (16 hour was significantly lower than all the other times), while in CTL cows pH decreased at 16 hour, but was only different from 4 and 8 hours (Figure 1A). At 60 days postpartum, ruminal pH at 16 h was different for all other times in PHY and CTL cows, while in MON cows it was not different from time 0 (Figure 1B).

Treatment tended (P=0.10) to affect total VFA, CTL cows presented greater (P<0.05) values than PHY and MON cows in period 30 (Table 7). Total VFA

was also affected by time and the interaction treatment by period. At 30 days postpartum, VFA in CTL cows decreased from 0 to 8 h; nevertheless, it remained stable in PHY and MON cows. Maximum concentration of VFA were observed at 16 h in all groups (Figure 1C). At 60 days postpartum, treatments showed similar patterns between them (Figure 1D).

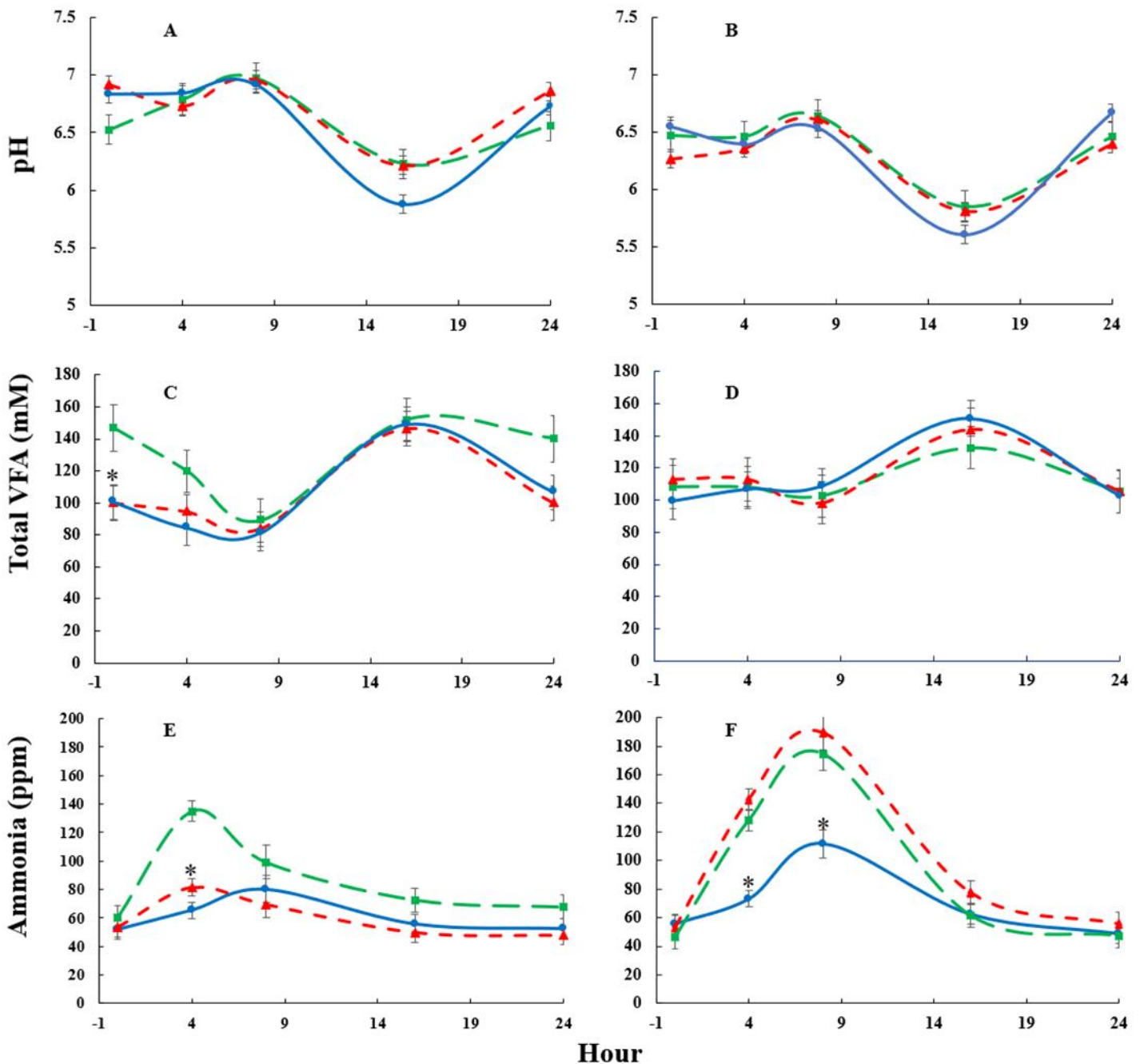


Figure 1.

Rumen pH (A, B), total concentration of volatile fatty acids (tVFA; C, D) and ammonia (E, F) for CTL (—), MON (—) and PHY (—) at 30 days postpartum (A, C, E) and 60 days postpartum (B, D, F). Hours shaded green indicate the time the cows were on pasture. The hours shaded in yellow indicate the time they had access to the TMR.

Acetate concentration was not affected by treatment; nevertheless, an interaction between period and treatment was observed. Acetate concentration was lower in CTL compared to the treatments at day 30, but at 60 days acetate proportion was higher (Figure 2). Propionate tended ($P=0.06$) to be greater in PHY than in CTL cows, while MON treatment was intermediate. Propionate concentration was not different between groups at 30 d, nevertheless, at 60 d PHY were greater ($P=0.01$) than CTL cows.

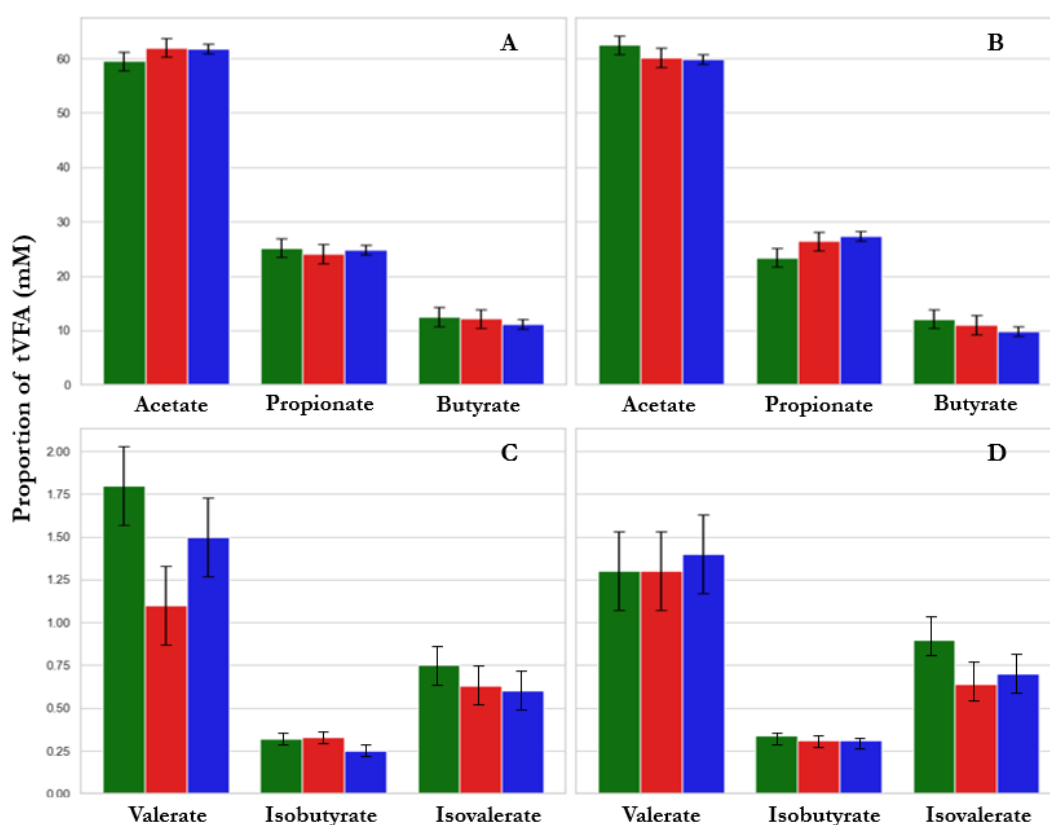


Figure 2. Proportion of VFA for CTL (■), MON (■) and PHY (■) at 30 days postpartum (A, C) and 60 days postpartum (B, D). Letters indicates different between treatments within each period.

Butyrate and isobutyrate was lower ($P<0.01$) in PHY cows. Valerate was lower in MON ($P=0.01$) at 30 d; however, it was not different at 60 d. Isovalerate was

lower in cows fed with additives. The acetate:propionate ratio was not affected by treatment, but it was affected by time and the treatment-period interaction ($P=0.02$). This ratio was lower in CTL cows at 30 d vs MON and PHY (2.41 vs 2.59, 2.50 ± 0.10 , respectively), and higher at 60 d postpartum (2.72 vs 2.32, 2.27 ± 0.10). The ratio ketogenic:glucogenic tended to be lower in PHY than in CTL cows ($P=0.08$), while MON was intermediate (Table 7).

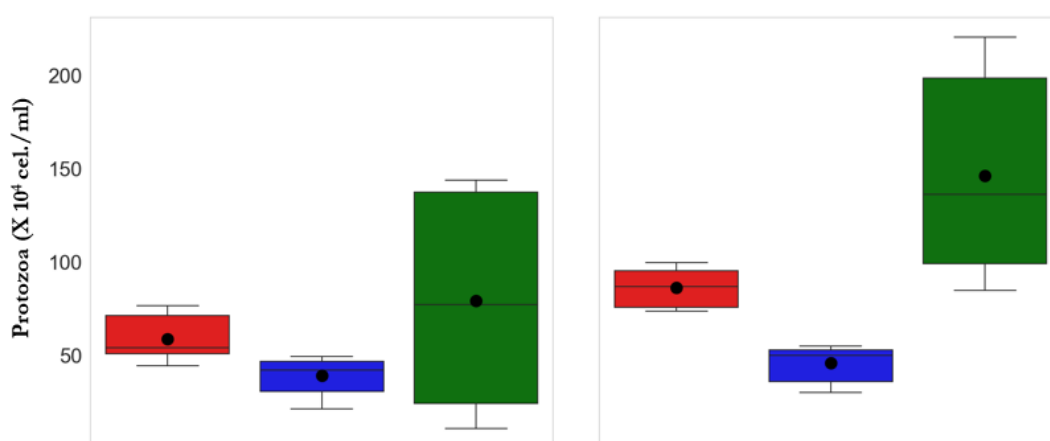


Figure 3.

Protozoa counts for CTL (■), MON (■) and PHY (■) at 30 days postpartum and 60 days postpartum. Letters indicates different between treatments within each period.

The concentration of NH_4 was affected by treatment, period, time and their interactions (Table 7, Figure 1E, F). In general, PHY cows exhibited lower NH_4 concentrations compared to CTL ($P<0.01$) and MON ($P<0.01$). In the first period (30 d), at 4 hours, CTL cows displayed higher NH_4 values compared to 0, 16 and 24 hours, whereas no differences were observed between the different time points in treatments cows. At 60 d, CTL and MON displayed similar patterns, with higher NH_4 values at 4 and 8 hours compared to 0, 16, and 24 hours, whereas no differences were observed in PHY cows between different times. The NH_4 concentration was lower at 30 days compared to 60 days postpartum ($P<0.01$) (Figure 1E, F).

At 30 days postpartum, the NH_4 concentration at 4 hours was higher ($P=0.01$) in CTL cows than in MON and PHY cows (Figure 1E). Conversely, at 60 days

postpartum, PHY cows exhibited lower ($P<0.05$) NH_4 concentrations at times 4 and 8 compared to CTL and MON cows (Figure 2F).

Protozoa concentrations were affected by treatment, MON and PHY treatments reduced ($P<0.01$) protozoa concentration compared to CTL cows and there was no difference between MON and PHY cows (Table 7). Period affected protozoa numbers: they were greater in 60 days postpartum than in 30 days (Figure 3).

Discussion

Performance

Previous studies using essential oils or monensin have not observed effects on BCS (McCarthy et al., 2015; Mullins et al., 2012; Tassoul and Shaver, 2009). However, a metanalysis noted an improvement in BCS with monensin supplementation due to better energy balance (Duffield et al., 2008b). However, these changes could be observed over a longer period and would not be reflected in short periods of time.

Supplementation with MON has decreased DMI and has been associated with a greater supply of propionate to the liver (Duffield et al., 2012), which has hypophagic effects due to hepatic oxidation (Oba and Allen, 2003), especially in stages where glucose demand is not higher; however, we did not observe changes in ruminal propionate during prepartum. On the other hand, DMI can be influenced by rumen filling, and changes in degradation rates can affect it. Partial protozoa defaunation was linked to lower total digestibility of DM, OM and NDF (Newbold et al., 2015), which could consequently decrease DMI.

During the prepartum, no changes in performance were observed with the use of PHY. Furthermore, DMI was not affected by the treatment, but was higher in PHY group compared to MON, with the same changes in the protozoa population. The greater amount of BCVFA in the rumen may have stimulated the growth of cellulolytic bacteria, resulting in greater NDF degradability in

diets where rumen filling acts as an intake limiter, which may have improved intake.

Since the BCS is linked to reserve mobilization during negative energy balance (NEB), the better BCS in MON cows may be correlated with a lower NEB. The supplementation with MON during the early postpartum period, when glucose demand is high, typically increases DMI. In this sense, McCarthy et al. (2015) observed higher DMI during the early lactation in dairy cows supplemented with MON. This faster recovery in DMI could potentially explain the lesser loss of BCS in MON cows. Another way in which monensin improves energy balance is by improving nutrient utilization efficiency through greater propionic fermentation; however, we did not observe changes in propionate fermentation in MON treatment.

During the transition period, cows have a high demand for glucose. Increasing glucose precursors effectively enhances lactose synthesis and, consequently, daily milk production. Increased intestinal supply of AA was observed with additives supplementation in grazing dairy cows (Ruiz et al., 2001) and has been attributed to its inhibitory action on hyper-ammonia producing bacteria and protozoa (Horst et al., 2023). Increasing the exit and uptake of gluconeogenic amino acids, consequently increasing glucose availability for milk yield and lactose synthesis (Rezaei Ahvanooei et al., 2023). Furthermore, the reduction in protozoa concentration in the rumen, as observed in previous studies, resulted in lower methane emissions. This indicates a more efficient energy utilization and, consequently, more efficient cows (Dai and Faciola, 2019). These changes in protozoa and NH_4 levels associated with additive supplementation could explain the differences observed in milk yield between treatments.

In multiparous cows, the use of additives presented no effect on performance, showing the variability in animal responses to these additives (Benchaar, 2021; Khiaosa-ard and Zebeli, 2013; Tassoul and Shaver, 2009). In grazing systems, NEB during the transition period in dairy cows is exacerbated due to

the limitation in DMI in the early postpartum period. Additionally, cows in grazing systems incur additional energetic costs associated with walking, foraging and grazing, further exacerbating NEB.

In primiparous cows, these limitations are amplified, since they have some difficulty adapting to grazing (Chilibroste et al., 2012) and lower dry matter intake (McEvoy et al., 2009), leading to metabolic disorders and greater immunodeficiency and difficulty in recovering from NEB (Meikle et al., 2013). Additionally, primiparous cows have high protein requirements for proper immune and metabolic function.

The mentioned differences between parities could have generated a distinct effect of the additives, influencing protein metabolism by increasing the supply of amino acids to the intestine. Phytochemicals have been employed for their antioxidant characteristics, enhancing the immune status in dairy cows (Daddam et al., 2023). This, in turn, may have favored the immune status of primiparous cows.

Ruminal pH, VFA, Ammonia and Protozoa Counts

The use of additives in ruminants interacts significantly with diet characteristics, particularly showing a greater impact in diets with higher carbohydrate content and lower pH levels in the rumen. The prepartum diet, containing 10% CP and formulated with a low concentration of starch (17%), may have influenced the response of PHY and MON on rumen bacteria, potentially contributing to the lack of findings on the main VFAs. On the other hand, it is known that approximately three weeks are required for the bacteria in the rumen to adapt to new conditions; this may be another reason for the small changes observed in the rumen during the prepartum period.

The effects of PHY on protozoa are related to the doses used (Khiaosa-ard and Zebeli, 2013). Dai and Faciola (2019), in their meta-analysis, did not observe phytochemicals as a reliable method to reduce protozoa concentration. However, Khiaosa-ard and Zebeli. (2013), in their meta-

analysis, found that low doses of PHY did not result in significant changes in protozoa counts, but higher doses led to a decrease in protozoa concentration. In our study, a significant decrease in protozoa was observed using high doses of PHY.

The mechanism of action of PHY on protozoa is poorly understood, possibly attributable to the reduction in cell membrane permeability thanks to the lipophilic nature of these compounds (Kholif and Olafadehan, 2021). The most consistent effects with lower ruminal protozoa concentrations are the lower concentration of ruminal NH_4 , which seem to be due to decreased bacterial protein breakdown and feed protein degradability (Newbold et al., 2015).

One effects of using MON and PHY on ruminal variables is the reduction of ruminal NH_4 concentrations. This reduction can be attributed to decreased deamination and degradation of peptides and amino acids (McIntosh et al., 2003) due to decreased activity of hyper-ammonia-producing bacteria (McIntosh et al., 2003) and, additionally, due to a decrease in the number of protozoa, which plays a significant role in protein degradation (Bodas et al., 2012). Furthermore, the bacteria that fill the gap generated by the decrease in protozoa are capable of assimilating NH_4 , while protozoa are not (Firkins, 2021).

The NH_4 concentration remained comparatively stable throughout the day in the PHY treatment, without showing the deamination peaks typically associated with pasture consumption. This effect was consistently observed in both periods, indicating greater stability in the rumen environment. This stability can be attributed to the effects primarily on HAP bacteria and protozoa concentrations. Controlling protein degradation may serve as an alternative approach to managing NH_4 levels without limiting bacterial growth, thereby increasing nitrogen utilization efficiency. This would result in an energy savings due to reduced NH_4 absorption, less transformation to urea and elimination (Calsamiglia et al., 2010).

The production of isoacids in the rumen is associated with the degradation of branched-chain AA. Previous studies have observed an increase in isoacids with the supplementation of phytochemicals (Khattab et al., 2020; Tekippe et al., 2013; Tomkins et al., 2015). In diets with low protein content, like prepartum diet, the response to PHY supplementation may differ compared to higher quality diets, as PHY can act as stimulants for isoacid production in these conditions. Tomkins et al. (2015) observed a similar increase in BCFVA with phytochemical supplementation in medium quality hay, which had characteristics like the pre-calving diet used in the present experiment.

During postpartum, the lower concentration of isoacids has been linked to a decrease in the protein degradation process (Bodas et al., 2012). The decrease in protein degradation is reflected by the reduction in ammonia in the rumen, although the decrease in ammonia is not always a direct reflection of lower protein degradation and may only be associated with lower protein deamination. In the case of MON supplementation, only a reduction in isovalerate was observed, which can reflect a shorter duration of the impact on ammonia concentration, observed only in period 30.

Conclusions

Supplementation with both additives was beneficial for the lactation performance of primiparous cows but not for multiparous cows. Our study observed that ruminal fermentation was affected by the treatments. Both additives altered protein metabolism in the rumen, potentially leading to more efficient nitrogen utilization, primarily due to a decrease in protozoa numbers. However, the effects of PHY were consistently observed in ammonia and protozoa levels throughout the entire experiment, whereas MON exhibited less consistent effects.

Acknowledgments

The authors thank the undergraduate students (Anaclara Daudet, Carolina Dorao, Ana Caceres, Tomás García, Lucía Clerici, Santiago Techera) of the Facultad de Agronomía (Universidad de la República, Uruguay), the staff of the Mario A. Cassinoni Experimental Unit for their hard daily work and care of experimental animals, the CCPA group (France, Jancé) and the national research and development agency (ANII, Uruguay) for scholarship or fund support.

References

- Ana, M., Daniel, C., Mariana, C., de Lourdes, A. M., Virginia, A., & Isabel, P. (2013). *Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: Un enfoque multidisciplinario*.
- Benchaar, C. (2021). Diet supplementation with thyme oil and its main component thymol failed to favorably alter rumen fermentation, improve nutrient utilization, or enhance milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 324–336. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18401>
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), 209–228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4), 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial

- Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580–2595.
<https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Reynolds, C. K., Kristensen, N. B., & Van Vuuren, A. M. (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*, 4(7), 1184–1196. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000911>
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture¹. *Journal of Animal Science*, 82(11), 3230–3236. <https://doi.org/10.2527/2004.82113230x>
- Chaney, A. L., & Marbach, E. P. (1962). Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia. *Clinical Chemistry*, 8(2), 130–132. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>
- Chilibroste, P., Mattiauda, D. A., Bentancur, O., Soca, P., & Meikle, A. (2012). Effect of herbage allowance on grazing behavior and productive performance of early lactation primiparous Holstein cows. *Animal Feed Science and Technology*, 173(3–4), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.02.001>
- Cedrola, F., Rossi, M., Dias, R. J. P., Martinele, I., & D'Agosto, M. (2015). Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. *Zoological Science*, 32(1), 8–15. <https://doi.org/10.2108/zs140125>
- Coates, D. B. and Penning, P. D. 2000. Measuring animal performance. in: t'Mannetje, L. and Jones, R. M. (ed.) *Field and Laboratory Methods for Grassland and Animal Production Research* CABI International, Wallingford, Oxon (CABI). pp. 353-402
- Committee on Nutrient Requirements of Dairy Cattle, Board on Agriculture and Natural Resources, Division on Earth and Life Studies, & National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2021). *Nutrient*

- Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition* (p. 25806). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25806>
- Daddam, J. R., Daniel, D., Kra, G., Pelech, I., Portnick, Y., Moallem, U., Lavon, Y., & Zachut, M. (2023). Plant polyphenol extract supplementation affects performance, welfare, and the Nrf2-oxidative stress response in adipose tissue of heat-stressed dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 106(12), 9807–9821. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23549>
- Dai, X., & Faciola, A. P. (2019). Evaluating Strategies to Reduce Ruminal Protozoa and Their Impacts on Nutrient Utilization and Animal Performance in Ruminants – A Meta-Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2648. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02648>
- Drong, C., Meyer, U., Soosten, D. von, Frahm, J., Rehage, J., Breves, G., & Dänicke, S. (2016). Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(3), 537–551. <https://doi.org/10.1111/jpn.12401>
- Duffield, T. F., Merrill, J. K., & Bagg, R. N. (2012). Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake¹. *Journal of Animal Science*, 90(12), 4583–4592. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-5018>
- Duffield, T. F., Rabiee, A. R., & Lean, I. J. (2008a). A Meta-Analysis of the Impact of Monensin in Lactating Dairy Cattle. Part 1. Metabolic Effects. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1334–1346. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0607>
- Duffield, T. F., Rabiee, A. R., & Lean, I. J. (2008b). A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1347–1360. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0608>
- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., & Webster, G. (1989). A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of*

Dairy Science, 72(1), 68–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0)

Erasmus, L. J., Robinson, P. H., Ahmadi, A., Hinders, R., & Garrett, J. E. (2005). Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 122(3–4), 219–239. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.03.004>

Firkins, J. L. (2021). Invited Review: Advances in rumen efficiency. *Applied Animal Science*, 37(4), 388–403. <https://doi.org/10.15232/aas.2021-02163>

Green, B. L., McBride, B. W., Sandals, D., Leslie, K. E., Bagg, R., & Dick, P. (1999). The Impact of a Monensin Controlled-Release Capsule on Subclinical Ketosis in the Transition Dairy Cow. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 333–342. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75240-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75240-9)

Haydock, K.P. and Shaw, N.H. (1975) The Comparative Yield Method for Estimating Dry Matter Yield of Pasture. *Australian Journal of Agriculture and Animal Husbandry*, 15, 663-670. <http://dx.doi.org/10.1071/EA9750663>

Horst, E. A., Kvidera, S. K., Hagerty, S., French, P. D., Carlson, D. B., Dhuyvetter, K., & Holloway, A. W. (2023). Effect of Monensin on Milk Production Efficiency and Milk Composition in Lactating Dairy Cows fed Modern Diets. *Journal of Dairy Science*, S002203022300721X. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23849>

Khattab, M. S. A., Kholif, A. E., Abd El Tawab, A. M., Shaaban, M. M., Hadhoud, F. I., El-Fouly, H. A., & Olafadehan, O. A. (2020). Effect of replacement of antibiotics with thyme and celery seed mixture on the feed intake and digestion, ruminal fermentation, blood chemistry, and

- milk lactation of lactating Barki ewes. *Food & Function*, 11(8), 6889–6898. <https://doi.org/10.1039/D0FO00807A>
- Khiaosa-ard, R., & Zebeli, Q. (2013). Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants¹. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1819–1830. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5691>
- Kholif, A. E., & Olafadehan, O. A. (2021). Essential oils and phytogetic feed additives in ruminant diet: Chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochemistry Reviews*, 20(6), 1087–1108. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09739-3>
- Mattiauda, D. A., Tamminga, S., Gibb, M. J., Soca, P., Bentancur, O., & Chilbroste, P. (2013). Restricting access time at pasture and time of grazing allocation for Holstein dairy cows: Ingestive behaviour, dry matter intake and milk production. *Livestock Science*, 152(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.12.010>
- McCarthy, M. M., Yasui, T., Ryan, C. M., Mechor, G. D., & Overton, T. R. (2015). Performance of early-lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 3335–3350. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8820>
- McEvoy, M., O'Donovan, M., Kennedy, E., Murphy, J. P., Delaby, L., & Boland, T. M. (2009). Effect of pregrazing herbage mass and pasture allowance on the lactation performance of Holstein-Friesian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(1), 414–422. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1313>
- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A., & Newbold, C. J. (2003). Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 5011–5014. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003>

- Méndez, M. N., Grille, L., Mendina, G. R., Robinson, P. H., Adrien, M. D. L., Meikle, A., & Chilbroste, P. (2023). Performance of Autumn and Spring Calving Holstein Dairy Cows with Different Levels of Environmental Exposure and Feeding Strategies. *Animals*, 13(7), 1211. <https://doi.org/10.3390/ani13071211>
- Mullins, C. R., Mamedova, L. K., Brouk, M. J., Moore, C. E., Green, H. B., Perfield, K. L., Smith, J. F., Harner, J. P., & Bradford, B. J. (2012). Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1323–1336. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4744>
- Newbold, C. J., De La Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., & McEwan, N. R. (2015). The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>
- Oba, M., & Allen, M. S. (2003). Dose-Response Effects of Intrauminal Infusion of Propionate on Feeding Behavior of Lactating Cows in Early or Midlactation. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2922–2931. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73889-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73889-2)
- Pons, M. V., Adrien, M. L., Mattiauda, D. A., Breijo, M. A., Meikle, A., Chilbroste, P., & Damián, J. P. (2023). Welfare of dairy cows in mixed feeding systems under two different conditions of confinement: Behavioral, biochemical and physiological indicators. *Applied Animal Behaviour Science*, 265, 105995. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2023.105995>
- Rezaei Ahvanooei, M. R., Norouzian, M. A., Piray, A. H., Vahmani, P., & Ghaffari, M. H. (2023). Effects of monensin supplementation on lactation performance of dairy cows: A systematic review and dose–response meta-analysis. *Scientific Reports*,

13(1), 568. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27395-9>

- Rodrigues, R. O., Cooke, R. F., Firmino, F. C., Moura, M. K. R., Angeli, B. F., Ferreira, H. A. O., Brandão, A. P., Gex-Fabry, M., Ostrensky, A., & Vasconcelos, J. L. M. (2019). Productive and physiological responses of lactating dairy cows supplemented with phytogenic feed ingredients1. *Translational Animal Science*, 3(4), 1133–1142. <https://doi.org/10.1093/tas/txz108>
- Ruiz, R., Albrecht, G. L., Tedeschi, L. O., Jarvis, G., Russell, J. B., & Fox, D. G. (2001). Effect of Monensin on the Performance and Nitrogen Utilization of Lactating Dairy Cows Consuming Fresh Forage. *Journal of Dairy Science*, 84(7), 1717–1727. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74607-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74607-3)
- Silva, R. B. D., Pereira, M. N., Araujo, R. C. D., Silva, W. D. R., & Pereira, R. A. N. (2020). A blend of essential oils improved feed efficiency and affected ruminal and systemic variables of dairy cows. *Translational Animal Science*, 4(1), 182–193. <https://doi.org/10.1093/tas/txz183>
- Tassoul, M. D., & Shaver, R. D. (2009). Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1734–1740. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1760>
- Tekippe, J. A., Tacoma, R., Hristov, A. N., Lee, C., Oh, J., Heyler, K. S., Cassidy, T. W., Varga, G. A., & Bravo, D. (2013). Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7892–7903. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7128>
- Tomkins, N. W., Denman, S. E., Pilajun, R., Wanapat, M., McSweeney, C. S., & Elliott, R. (2015). Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensin in beef cattle fed a tropical grass hay. *Animal Feed Science and Technology*, 200, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.11.013>